

# **Spezifische Modifikation von Partikeloberflächen: Grenzflächenstabilisierung in Lösung und in 3D-Kompositen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Chemie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl.-Chem. Felix Hanßke

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr.-Ing. Dr. Sabine Kunst

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät:

Prof. Dr. Elmar Kulke

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. Hans G. Börner
2. Prof. Dr. Erhard Kemnitz
3. Prof. Dr. Tanja Weil

Tag der mündlichen Prüfung: 21.07.2017





## Abstract

The preparation of new high-performance materials requires the development of established strategies. To create materials with excellent properties like these of natural biomaterials, ideas from Nature can be adapted. However, the control over complex hierarchical, highly ordered structures is difficult to realize synthetically. Inspired by natural interface proteins in bone, bifunctional bioconjugates were exploited for different interface stabilization applications.

The interfaces of nanoparticles both in solution and in polymeric composites were stabilized by combinatorially selected, material specific peptide-polymer conjugates. Peptide sequences showing affinity to  $\text{MgF}_2$  particle surfaces were selected from a phage display library and translated into a  $\text{MgF}_2$ -binding peptide-*block*-poly(ethylene glycol) conjugate (MBC). The MBC combined the material-affine binding of the monodisperse peptide domain with an additional function of a synthetic polymer block.

Detailed studies of the binding properties of MBC and congeneric conjugates with other peptide architectures or different polymer block lengths, as well as varied incubation conditions revealed the potential of the sequence-specific MBC to stabilize  $\text{MgF}_2$  nanoparticles in solution. The conjugate inhibited the agglomeration of the particles. In contrast to established stabilizers, it enabled fully redispersable nanoparticles even after complete drying.

The stabilization approach in solution was expanded to the compatibilization of the particles in polycaprolactone (PCL) composites. Inspired by the structure of highly specific interface proteins, MBC optimized the material properties of biodegradable PCL/ $\text{MgF}_2$  composites. Tailoring the internal interfaces enabled melt-based 3D printing of PCL/ $\text{MgF}_2$  compounds by reducing the agglomeration tendency of the particles and increasing the interactions between the filler particles and the matrix polymer. Additionally, the interface stabilization simultaneously increased both the stiffness and the toughness of the composites up to the range of natural bone. The addition of hydroxyapatite alongside MBC-compatibilized  $\text{MgF}_2$  to PCL created a bioactive material that showed enhanced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and the mineralization of new bone tissue. Therefore, a mechanically reinforced, osteoinductive material was prepared showing high potential in extensive *in vitro* studies for biomedical applications such as guided bone regeneration, yet not limited to that.

## Kurzzusammenfassung

Zur Nachbildung von Hochleistungsmaterialien können Ideen aus der Natur adaptiert werden. Diese Materialien weisen vergleichbar hervorragende Eigenschaften auf wie natürliche Biomaterialien. Deren hierarchischer, definierter Aufbau ist allerdings schwierig zu reproduzieren. Inspiriert durch natürliche Grenzflächenproteine in Knochen wurden bifunktionale Biokonjugate für verschiedene Grenzflächenstabilisierungen genutzt.

In einem kombinatorischen Ansatz wurden materialspezifische Peptid-*block*-Polyethylenglycol-Konjugate eingesetzt, um die Grenzflächen von Nanopartikeln in Lösung sowie in Polymerkompositen zu stabilisieren. Dazu wurden biokombinatorisch ausgewählte Peptid-Sequenzen mit einer Affinität für  $\text{MgF}_2$ -Oberflächen in Form eines  $\text{MgF}_2$ -bindenden Konjugats (MBC) synthetisiert, welches die materialaffine Bindung der monodispersen Peptid-Domäne mit der zusätzlichen Funktion des synthetischen Polymer-Blocks verbindet.

Aus detaillierten Untersuchungen der Bindungseigenschaften von MBC und davon abgeleiteten Konjugaten mit variierten Peptidarchitekturen bzw. Polymer-Blocklängen bei verschiedenen Inkubationsbedingungen ging hervor, dass das sequenzspezifisch bindende MBC das Potenzial zur Stabilisierung von  $\text{MgF}_2$ -Nanopartikeln hat. Das Konjugat verhinderte die Agglomeration der Partikel und ermöglichte im Gegensatz zu etablierten Stabilisatoren die vollständige Redispergierbarkeit sogar nach Eintrocknung.

Die Stabilisierung in Lösung wurde auf die Kompatibilisierung von Partikeln in Polycaprolacton (PCL)-Kompositen übertragen, in denen das grenzflächenaktive MBC die Materialeigenschaften von bioabbaubaren PCL/ $\text{MgF}_2$ -Kompositen optimierte. Durch die reduzierte Agglomeration und die verstärkten Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und der Polymermatrix konnten mittels 3D-Druck-Techniken definierte, poröse 3D-Gerüste hergestellt werden. Die Grenzflächenstabilisierung führte zur gleichzeitigen Erhöhung der Steifigkeit und der Zähigkeit der Materialien bis in den Bereich natürlicher Knochen. Durch die gemeinsame Zugabe von MBC-kompatibilisiertem  $\text{MgF}_2$  und Hydroxylapatit zu PCL wurde ein bioaktives Material geschaffen, das nachweislich die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und die Mineralisierung von neuem Knochengewebe unterstützte. Damit stellt es ein vielversprechendes Komposit für die Regeneration von Knochengewebe und weitere Anwendungen dar.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abstract .....</b>	<b>I</b>
<b>Kurzzusammenfassung.....</b>	<b>II</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1 Motivation und Zielstellung.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Theoretischer Hintergrund .....</b>	<b>3</b>
2.1 Künstliche Knochen durch regenerative Medizin .....	3
2.1.1 Natürliche Knochen.....	5
2.1.2 Synthetischer Ersatz für Biomaterialien.....	8
2.2 Ansatz für neuartige 3D-Komposite für den Knochenersatz .....	18
2.2.1 Stabilisierung von Partikeln in Lösung.....	18
2.2.2 Partikelsynthese.....	23
2.2.3 Polymermatrix .....	27
2.2.4 Bioinspirierte Grenzflächenstabilisierung.....	28
<b>3 Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>39</b>
3.1 Grenzflächenstabilisierung von Nanopartikeln in Lösung .....	39
3.1.1 Adsorption von Peptid-Polymer-Konjugaten auf $\text{MgF}_2^{[140]}$ .....	40
3.1.2 Größenstabilisierung von $\text{MgF}_2$ -Nanopartikeln <sup>[140]</sup> .....	69
3.2 Kompatibilisierung in Verbundmaterialien .....	77
3.2.1 3D-Komposite mit mechanischer Verstärkung <sup>[183]</sup> .....	79
3.2.2 3D-Komposite mit mechanisch-biologischer Verbesserung <sup>[183]</sup> .....	105
<b>4 Zusammenfassung .....</b>	<b>123</b>
<b>5 Ausblick .....</b>	<b>127</b>
<b>6 Experimentalteil.....</b>	<b>129</b>
6.1 Materialien.....	129
6.2 Methoden .....	132
6.3 Synthesen.....	149

<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>159</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>171</b>
	<b>Danksagung.....</b>	<b>i</b>
	<b>Selbstständigkeitserklärung.....</b>	<b>iv</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Die Aminosäuren wurden gemäß des Drei- und Einbuchstabencodes der *International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Joint Commission on Biochemical Nomenclature* bezeichnet.

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
AFM	<i>atomic force microscopy</i> , Rasterkraftmikroskopie
ALP	Alkalische Phosphatase
All	Allyl-
Äq.	Äquivalente
BAM	Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung, Berlin
BET	Brunauer-Emmet-Teller
CAD	<i>computer-aided design</i> , Rechnerunterstütztes Design
$\alpha$ CHCA	$\alpha$ -Cyano-4-hydroxycinnamic acid, $\alpha$ -Cyano-4-hydroxyzimtsäure
CP MAS	<i>cross-polarization magic angle spinning</i>
CNT	<i>carbon nanotubes</i> , Kohlenstoffnanoröhren
DCM	Dichlormethan
Dde	Bis- <i>N</i> -[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl]-
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DLS	dynamische (Laser-)Lichtstreuung
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> , ein Zellmedium
(ds)DNA	<i>(double-stranded) deoxyribonucleic acid(s)</i> , (doppelsträngige) Desoxyribonukleinsäure(n)
DP <sub>n</sub>	<i>degree of polymerization</i> , Polymerisationsgrad
DSC	<i>dynamic scanning calorimetry</i> , dynamische Differenzkalorimetrie
EDX	<i>energy dispersive X-ray spectroscopy</i> , energiedispersive Röntgenspektroskopie
FDM	<i>fused deposition modeling</i> , Schmelzschichtung
Fmoc-	9-Fluorenylmethoxycarbonyl-
FMZ	Lehrstuhl für Funktionsmaterialien der Medizin und der Zahnheilkunde
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase

HA	Hydroxylapatit
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> , Hochleistungsflüssigchromatographie
HUB	Humboldt-Universität zu Berlin
ICP	<i>inductively coupled plasma</i> , induktiv gekoppeltes Plasma
IHBI	Institute for Health and Biomedical Innovation
IR	Infrarot
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
MALDI-	<i>matrix-assisted laser desorption/ionization</i> , Matrix-unterstützte Laser-desorption/Ionisation-
MBC	<i>MgF<sub>2</sub>-binding peptide-PEG conjugate</i> , MgF <sub>2</sub> -bindendes Peptid-PEG-Konjugat
MBC <sup>SC</sup>	<i>scrambled MgF<sub>2</sub>-binding peptide-PEG conjugate</i> , randomisiertes MgF <sub>2</sub> -bindendes Peptid-PEG-Konjugat
MBP	<i>MgF<sub>2</sub>-binding peptide</i> , MgF <sub>2</sub> -bindendes Peptid
MBP <sup>SC</sup>	<i>scrambled MgF<sub>2</sub>-binding peptide</i> , randomisiertes MgF <sub>2</sub> -bindendes Peptid
MEM	<i>minimum essential medium</i> , ein Zellmedium
MES	siehe MEW: <i>melt electrospinning</i> , Schmelzelektrospinnen
MEW	<i>melt electrospinning writing</i> , Schmelzelektrospinnen (in Schreibmodus)
MS	Massenspektrometrie
(h)MSCs	<i>(human) mesenchymal stem cells</i> , (humane) mesenchymale Stammzellen
NCP	<i>non-collagenous protein</i> , nicht-kollagenes Protein
NFES	<i>near-field electrospinning</i> , Nahfeld-Elektrospinnen
nHA	siehe HA: Hydroxylapatit-Nanopartikel/-plättchen
NMM	<i>N-Methylmorpholin</i>
NMP	<i>N-Methyl-2-pyrrolidon</i>
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> , Kernspinresonanz
NTU	Nanyang Technological University, Singapore
OES	optische Emissionsspektroskopie
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCL	<i>Poly(-ε-)caprolacton</i>
PCR	<i>real-time polymerase chain reaction</i> , Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion
PLGA	<i>poly(lactic-co-glycolic acid)</i> , Polylactid-co-Glycolid
P(L)LA	<i>poly(-L-)lactic acid</i> , Poly(-L-)milchsäure, auch: Poly(-L-)lactid
prep	<i>preparative</i> , präparative
PyAOP	(7-Azabenzotriazol-1-yl)-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat
PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat

QUT	Queensland University of Technology
RNA	<i>ribonucleic acid(s)</i> , Ribonukleinsäure(n)
RT	Raumtemperatur
Runx2	<i>runt-related transcription factor 2</i> , ein Protein und Transkriptionsfaktor
SAXS	<i>small-angle X-ray scattering</i> , Kleinwinkelröntgenstreuung
SCF	<i>supercritical fluid</i> , überkritisches Fluid
SEC	<i>size exclusion chromatography</i> , Größenausschlusschromatographie
SEM	<i>scanning electron microscopy</i> , Rasterelektronenmikroskopie
SES	<i>solution electrospinning</i> , Lösungselektrospinnen
SLA	<i>stereolithography (apparatus)</i> , Stereolithographie
SMFS	<i>single molecule force spectroscopy</i> , Einzelmolekülkraftspektroskopie
SPPS	<i>solid-phase supported peptide synthesis</i> , festphasengebundene Peptid-synthese
TCP	Tricalciumphosphat
TFA	<i>trifluoroacetic acid</i> , Trifluoressigsäure
TEM	<i>transmission electron microscopy</i> , Transmissionselektronenmikroskopie
TIPS	<i>thermally induced phase separation</i> , thermisch induzierte Phasentrennung
TMSBr	Bromotrimethylsilan
ToF-	<i>time of flight-</i> , Flugzeit-
WSB	Wasserstoffbrücken-Bindungen
(P)XRD	<i>(powder) X-ray diffraction</i> , (Pulver-)Röntgenbeugung





## 1 Motivation und Zielstellung

Eine industrialisierte Welt stellt stetig wachsende Ansprüche an Produkte in allen Bereichen des Lebens. Auf der Suche nach Lösungen, um Flugzeuge treibstoffsparender, Reifen anpassungsfähiger und Implantate verträglicher zu gestalten, werden häufig Ideen aus der Natur für verschiedene Werkstoffe und Produkte adaptiert.<sup>[1]</sup> Außerdem wird von modernen Materialien erwartet, dass diese mehr als eine einzelne Aufgabe exzellent erfüllen. Diese gewachsenen Anforderungen treiben die Entwicklung organisch-anorganischer Komposit- oder Verbundmaterialien voran. Hierbei handelt es sich um Mehrkomponentensysteme, die ein Optimum der Eigenschaften der Einzelkomponenten erreichen sollen.<sup>[2]</sup> Mittlerweile ist bekannt, dass die Grenzflächen zwischen den verschiedenen Bestandteilen entscheidenden Einfluss auf die finalen Materialeigenschaften ausüben.<sup>[3]</sup> Die Einstellung der Wechselwirkungen an dieser Grenzfläche birgt das Potenzial zur weitreichenden und maßgeblichen Verbesserung von vielen Verbundwerkstoffen.

Wegen ihrer strukturellen Vielseitigkeit, der einfachen Verarbeitung und nicht zuletzt aus Kostengründen sind synthetische Polymere mit einem jährlichen Umsatz von 27.8 Mrd. Euro zu einem wichtigen Pfeiler der deutschen chemischen Industrie geworden. Das entspricht knapp einem Fünftel des Gesamtjahresumsatzes 2015 der chemisch-pharmazeutischen Industrie in Deutschland. Nach der Argumentation von Eyerer sind "Kunststoffe [...] Werkstoffe nach Maß".<sup>[2]</sup> Synthetische Polymere weisen jedoch im Gegensatz zu ihren natürlich vorkommenden Analoga Defizite auf, wenn es um komplexe Strukturen und Funktionalität geht. Die mangelnde Kontrolle über die Monomersequenz verhindert spezifische Wechselwirkungen mit anderen Molekülen sowie strukturelle Faltungen oder Aggregationen, wie sie z. B. in Peptiden, Proteinen oder Desoxyribonukleinsäuren für programmierbare, biologische Aufgaben verantwortlich sind. Hybridmaterialien wie Peptid-Polymer-Konjugate verknüpfen die strukturelle Vielfalt von synthetischen Polymeren und die Sequenzkontrolle von natürlichen Polymeren und beweisen bereits seit den letzten Jahrzehnten ihr Potenzial für pharmazeutische und materialwissenschaftliche Anwendungen.<sup>[4]</sup>

In dieser Arbeit sollen Peptid-Polymer-Konjugate genutzt werden, die sequenzspezifisch auf  $\text{MgF}_2$ -Oberflächen adhärieren, um die Grenzflächen Partikel/Lösung und Partikel/Polymermatrix zu stabilisieren. Mit Hilfe einer biokombinatorischen Methode wird eine materialbindende Peptidsequenz ausgewählt, welche in Form eines Peptid-

Polyethylenglykol (PEG)-Konjugats hergestellt wird. Für ein besseres Verständnis der Adhäsion komplexer Peptide auf anorganischen Oberflächen werden diverse Struktur- und Bindungsparameter am Beispiel der  $\text{MgF}_2$ -bindenden Sequenz auf  $\text{MgF}_2$ -Oberflächen untersucht. Die erhaltenen Kenntnisse sollen dazu genutzt werden, die Oberflächen von  $\text{MgF}_2$ -Nanopartikeln effektiv zu beschichten. Diese materialspezifische Oberflächenmodifikation soll dazu beitragen, die Nanopartikel in Lösung zu stabilisieren und ihre Dispergierbarkeit zu verbessern.

Die Übertragung dieses Konzepts der Stabilisierung von Nanopartikeln in Lösung soll anschließend auf den Einsatz in Polymer-Partikel-Verbundmaterialien erweitert werden. Dies setzt eine stabile Beschichtung der Partikel voraus, die auch beim Einbringen der Partikel in das Matrixpolymer bestehen bleibt. Die Modifikation der anorganischen Partikeloberflächen mit Polymerfunktionalitäten soll die Mischbarkeit verbessern, die Wechselwirkungen zwischen den anorganischen und den organischen Phasen verstärken und somit die Partikel im Polymer kompatibilisieren. Die resultierenden Verbundstoffe werden speziell auf die Anwendung als Gerüstmaterialien für die Heilung großer Knochendefekte ausgerichtet. Dazu muss es möglich sein, die mehrphasigen Komposite zu hochporösen und dennoch stabilen 3D-Gerüsten zu verarbeiten, sodass um diese 3D-Strukturen herum neues Knochengewebe gebildet werden kann. Des Weiteren sollen die Hybridmaterialien unter physiologischen Bedingungen abbaubar sein, damit am Ende einer erfolgreichen Therapie nur noch natürlicher, neugebildeter Knochen zurückbleibt. Um den Weg zu diesem Ziel zu ebnen, muss ein breites Spektrum an analytischen Methoden genutzt und für diese interdisziplinäre Herausforderung angepasst werden. Nur so können die neu dargestellten, synthetischen Biomaterialien ausreichend verstanden werden, um die optimalen Materialeigenschaften einzustellen. Im Zentrum stehen dabei die Verbesserung der mechanischen sowie der biologischen Eigenschaften, die eine geführte Knochenheilung unterstützen. Die Grenzflächenstabilisierung soll dabei zum einen eine ausreichende mechanische Stabilität der synthetischen Materialien ermöglichen, die üblicherweise nur natürlichen Biomaterialien zu Eigen ist. Zum anderen soll die Zugabe von anorganischen Partikeln die Bioaktivität der sonst biologisch inerten Polymere erhöhen.

## 2 Theoretischer Hintergrund

Die theoretischen Grundlagen dieses Kapitels vermitteln dem Leser in Kürze notwendige Hintergründe, die zur Bearbeitung dieses Themas geführt haben. Das Kapitel 2.1 bildet das Fundament für das Verständnis der Motivation und die Herausforderungen in der regenerativen Medizin. Für diese Anwendung sollen verstärkte Polymer-Komposite für tragende Anwendungen bei der Knochenheilung entwickelt werden. Kapitel 2.2 beschreibt die Grundlagen der Herstellung bzw. die Auswahl der verwendeten Einzelkomponenten, durch deren strukturierte Kombination die neuartigen Kompositmaterialien entstehen sollen.

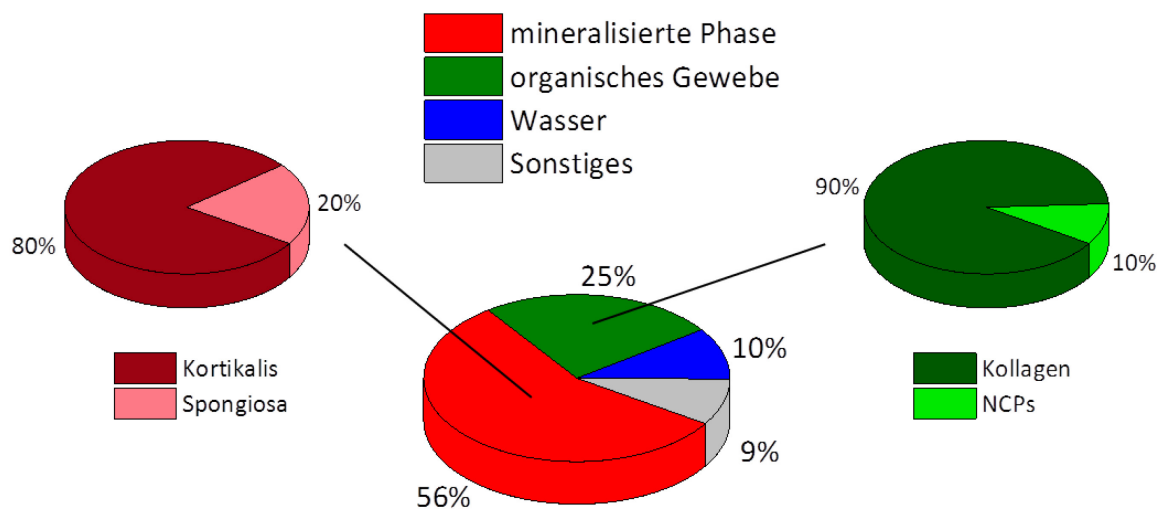
### 2.1 Künstliche Knochen durch regenerative Medizin

Mit der weltweit steigenden Lebenserwartung der Menschen erhöht sich der Bedarf an medizinischer Versorgung. Besonders der Wille zu höherer Lebensqualität im Alter bedingt die wissenschaftliche Entwicklung in neuen, medizinischen Fachgebieten. Eines dieser Gebiete ist die regenerative Medizin, die auf die Wiederherstellung erkrankter oder funktionsgestörter Zellen, Gewebe und Organe abzielt.<sup>[5]</sup> Dazu gehört auch das (*Bone*) *Tissue Engineering* (dt. (Knochen-)Gewebezüchtung), das sich u. a. mit der Kultivierung von künstlichen, dennoch funktionalen Knochengeweben beschäftigt. Die Notwendigkeit für synthetische Strategien zum Knochenersatz wird durch die Tatsache belegt, dass Knochen direkt nach Blut das am häufigsten transplantierte Gewebe sind.<sup>[6]</sup> 2.2 Mio. Knochen(teile) werden weltweit jährlich transplantiert.<sup>[7]</sup> In der Chirurgie ist die Verwendung von natürlichen Knochenteilen vorherrschend. Mit 58% sind die meisten Transplantate autogen und stammen damit vom Patienten selbst.<sup>[8]</sup> Allogene Knochentransplantate, d. h. natürliche Knochen von fremden Spendern, machen 34% aus.<sup>[9]</sup> Diese beiden Möglichkeiten gelten bis heute als Goldstandard, weil sie bereits vorhandenes, natürliches Gewebe nutzen.<sup>[10]</sup> Der Einsatz ist jedoch durch die geringe Verfügbarkeit und die Größe der Knochenteile sowie durch Komplikationen wie Immunabstoßung, Übertragung von Krankheitserregern und Morbidität im Spenderbereich begrenzt. Diese Limitierungen führen dazu, dass synthetische Strategien interessanter werden und die Translation vom Labor in die Klinik vorangetrieben wird.<sup>[11]</sup>

Dieses Kapitel vermittelt einen Überblick über das *Bone Tissue Engineering* und die zahlreichen Anforderungen, die an Knochenersatzmaterialien gestellt werden. Die Entwicklung von bioinspirierten Forschungsansätzen wird anhand des Aufbaus und der Eigenschaften von natürlichen Knochen diskutiert. Dabei wird der Schwerpunkt auf die Nutzung von synthetischen Materialien und deren Verarbeitung mittels 3D-Druckverfahren zur Herstellung poröser Gerüststrukturen für die geführte Geweberegeneration gelegt. Die Schmelzschichtung (engl. *fused deposition modeling*, FDM) und das Schmelzelektrospinnen (engl. *melt electrospinning writing*, MEW) werden hierbei hervorgehoben, weil sie im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt werden.

### 2.1.1 Natürliche Knochen

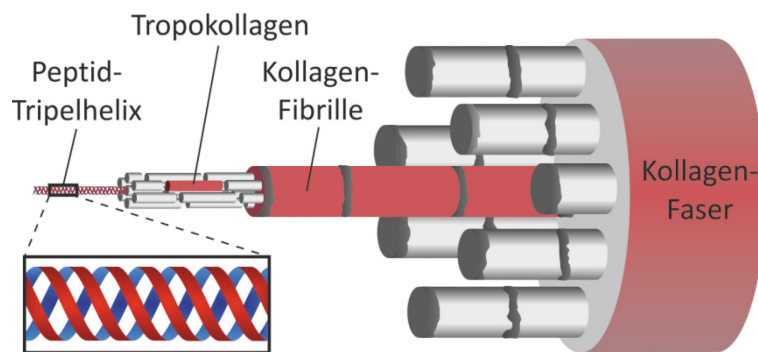
Natürliches Knochengewebe ist ein organisch-anorganisches Nanokomposit. Es besteht aus mineralisierten Bereichen, die mit organischem Gewebe durchzogen sind. Es handelt sich um dynamisches Gewebe, das sehr gut durchblutet ist und stetig von knochenbildenden Osteoblasten bzw. knochenabbauenden Osteoklasten aus- und wieder zurückgebildet wird. Die organische Matrix besteht zu etwa 90% aus Kollagen und über 200 verschiedenen sog. nicht-kollagenen Proteinen (engl. *non-collagenous proteins*, NCPs) (Abbildung 1 rechts).<sup>[12]</sup>



**Abbildung 1: Prozentuale Zusammensetzung von natürlichem Knochen: Hauptkomponenten (mittig) und weitere Unterteilungen der mineralisierten Phase (links) und des organischen Gewebes (rechts).**

Die NCPs machen etwa 10% des organischen Teils aus und sind am dynamischen Auf- und Abbauprozess der mineralischen Phasen beteiligt.<sup>[13]</sup> Die organische Phase ist für die Zähigkeit von Knochen maßgeblich. Die anorganische Phase, die wiederum die Festigkeit ausmacht, besteht hauptsächlich aus Hydroxylapatit (HA), dem die Strukturformel  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  am ehesten entspricht und welches nanoskopische Plättchen mit Dicken von etwa 2-10 nm, Längen von ca. 20-50 nm und Breiten von etwa 15-30 nm ausbildet.<sup>[12]</sup> Neben der mineralisierten Phase mit etwa 56% und dem organischen Gewebe mit ungefähr 25% macht Wasser mit ca. 10% den dritten Hauptbestandteil natürlicher Knochen aus (Abbildung 1 mittig).<sup>[12, 14]</sup> Es ist sowohl in flüssiger als auch in gebundener Form im Knochen vorhanden und beeinflusst dessen mechanische Eigenschaften auf verschiedene Weisen. Einerseits füllt es Zwischenräume zwischen Kollagenfibrillen. Andererseits stabilisiert es dessen Helix-Struktur durch die Ausbildung von Wasserstoffbrücken-Bindungen (WSB). Des Weiteren ist es essentiell

für die ständige Remodellierung der mineralischen Bereiche, indem es als Medium für die Zellen dient, die an dieser Biomineralisation beteiligt sind.<sup>[15]</sup> Die mineralisierten Bereiche unterteilen sich in die feste Knochenrinde, die Kortikalis (etwa 80% des Skeletts),<sup>[16]</sup> die die Hauptfestigkeit liefert, und das schwammartige, von organischem Gewebe durchzogene Innere, die Spongiosa (auch: trabekulärer Knochen, verbleibende 20% des Skeletts) (Abbildung 1 links). Letztere hat mit 70-95% Porosität sehr offene Strukturen, was für die Durchblutung des lebenden Gewebes entscheidend ist.<sup>[17]</sup>



**Abbildung 2: Hierarchisches Motiv in natürlichen Materialien am Beispiel von Kollagenfasern: Diese Art des Aufbaus sorgt für mechanische Stabilität. Beginnend bei Peptidketten, die sich zu Tripelhelizes zusammenlagern, entstehen Fibrillen und Fasern als größere Strukturelemente (nach <sup>[18]</sup>).**

Ausgehend von der mikroskopischen Ebene sind die kleinsten Bauelemente das Kollagen und die HA-Nanoplättchen.<sup>[12]</sup> Peptide, vorwiegend bestehend aus Gly, Pro und Hydroxyprolin, bilden Kollagen-Tripelhelizes (sog. Tropokollagen), die sich zu Fibrillen zusammenlagern (Abbildung 2).<sup>[18]</sup> Um diese herum und zwischen diese werden die HA-Nanokristalle (nHA) in ausgerichteter Form arrangiert. Die nHA-Kristallite sind periodisch in regelmäßigem Versatz, parallel zur Kollagenrichtung angeordnet. Die Fibrillen formen Kollagenfasern als nächstgrößeres Strukturelement, welche im Knochen wiederum als Faserbündel vorkommen.

Obwohl die Zusammensetzung von Knochen so genau bekannt ist, ist es bisher nicht möglich, ein vergleichbar funktionales, vollsynthetisches Konstrukt herzustellen. Knochen überzeugen besonders durch ihre exzellenten mechanischen Eigenschaften, die auf dem hierarchischen, anisotropen Aufbau basieren. Sie haben eine hohe mechanische Stärke, ohne dabei brüchig zu sein und sind elastisch genug, um die tragende Funktion des Skeletts zu übernehmen. Aus der Sicht der Werkstoffwissenschaften vereinen sie damit hohe Elastizitätsmoduln (auch: E-Moduln, engl. *elastic moduli*) bzw. Streckgrenzen (engl. *yield strengths*) und Zähigkeiten (engl. *toughnesses*), sowohl unter Zug- als auch Kompressionsbelastungen. Die Literaturangaben zu den mechanischen

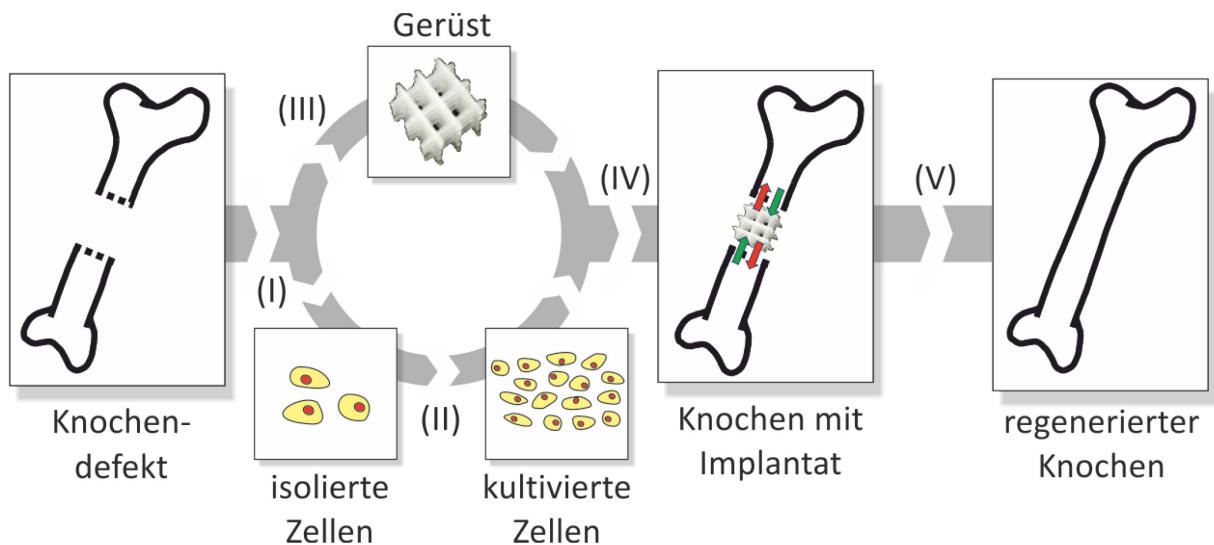
Knocheneigenschaften können je nach Belastungsmethode nur als Bereiche angegeben werden. Die Elastizitätsmoduln, die Streckgrenze und die Druckfestigkeit (engl. *compressive strength*) der Spongiosa liegen demnach bei 100-500 MPa (Zugmodul)<sup>[19]</sup> bzw. 50-900 MPa (Kompressionsmodul),<sup>[20]</sup> 1.5-38 MPa und 1.5-5 MPa.<sup>[21]</sup> Bei der Kortikalis rangieren die Werte bei 3.9-29.2 GPa (Zugmodul) bzw. 5-35 GPa (Kompressionsmodul), 60-170 MPa (Zugfestigkeit) und 50-280 MPa (Druckfestigkeit).<sup>[19]</sup> Die breiten Verteilungen sind verständlich, da viele Faktoren wie Spenderalter und -geschlecht, Hydrierungsgrad, Knochenart oder Ausrichtung des Knochens in der Testvorrichtung mit ins Ergebnis einfließen.

### 2.1.2 Synthetischer Ersatz für Biomaterialien

Künstliche Biomaterialien sind Stoffe, die biologische Strukturen ersetzen können. Dabei können Sie rein synthetischen, aber auch selbst biologischen Ursprungs sein. Die Anforderungen an synthetische Biomaterialien basieren auf dem Wissen über natürliche Knochen. Im Idealfall erfüllen die künstlichen Gerüste folgende Bedingungen, um strukturell und funktional die Knochenheilung zu unterstützen.<sup>[22]</sup> (i) Die Ersatzmaterialien sollten die physikalisch-chemischen Charakteristika der Knochenoberfläche nachahmen, weil die Biokompatibilität für eine erfolgreiche Therapie notwendig ist. (ii) Für eine erfolgreiche Therapie sollte das Implantat Bedingungen schaffen, die Zellen auch in einer natürlichen extrazellulären Matrix vorfinden. Hierbei spielen chemische und biologische Signalgeber wie Wachstumsfaktoren oder Wirkstoffe eine Rolle, die das Verhalten von Zellkulturen steuern. (iii) Außerdem sollten die mechanischen Eigenschaften der Gerüste denen von natürlichen Knochen entsprechen, weil bekannt ist, dass die Steifigkeit eines Materials das Wachstum, die Differenzierung und die Expression extrazellulärer Proteine von Stammzellen beeinflusst.<sup>[23]</sup> (iv) Das Gerüst sollte dreidimensional (3D) sein und ein komplett verbundenes Porensystem mit hoher Porosität besitzen. Nur so kann die Besiedlung mit Zellen und eine erfolgreiche Ausbildung von Blutgefäßen (Vaskularisierung) gewährleistet werden, was für den Transport von Blut inklusive aller nötigen Nährstoffe, Sauerstoff sowie Abfallprodukten notwendig ist. Für die Migration von Zellen in die Gerüste sind Porendurchmesser von mindestens 100 µm nötig.<sup>[19]</sup> (v) Insgesamt muss das Ersatzmaterial mindestens die Infiltration von Zellen und deren Festsetzung ermöglichen (Osteokonduktivität).<sup>[24]</sup> Außerdem sollte es körpereigene Bindegewebszellen ansiedeln und die Differenzierung von Stammzellen in Osteoblasten erleichtern (Osteoinduktivität). Nach erfolgreichem Gewebewachstum muss die Osseointegration gelingen, die den Vorgang der Vereinigung zwischen neugebildetem und vorhandenem, natürlichen Knochen beschreibt.

Im Hinblick auf funktionale Ersatzmaterialien, die nur solange im Organismus bleiben wie die Knochenheilung unterstützt werden muss, haben poröse, bioabbaubare 3D-Strukturen eine hohe Aufmerksamkeit erlangt. Diverse Herstellungsverfahren können poröse 3D-Gerüste schaffen, die der schwammartigen Spongiosa ähneln und zusätzlich noch bioabbaubar sind.





**Abbildung 3: Gerüstbasierte Knochengewebezüchtung (engl. *Bone Tissue Engineering*):** (I, II) Isolation und Kultivierung von (Stamm-)Zellen, (III) 3D-Druck von Gerüststrukturen nach patienten- und defektspezifischer Vorlage, (IV) Besiedlung des Gerüsts mit Zellen und anschließende Implantation, (V) Knochenheilung und Abbau des bioresorbierbaren Gerüsts.

Die prinzipielle Idee des gerüstbasierten *Bone Tissue Engineering* ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Zuerst werden Zellen aus dem entsprechenden Gewebe isoliert (I), kultiviert und vermehrt (II). Währenddessen können die genauen Ausmaße des Defekts bspw. durch Computertomographie patientenspezifisch vermessen werden. Anhand dieser Daten lässt sich durch 3D-Drucktechniken ein poröses Gerüst mit passenden Abmaßen herstellen (III). Auf diesem werden die kultivierten Zellen angesiedelt. Das zellbewachsene Gerüst wird in die Defektstelle implantiert (IV) und der durch das Gerüst geführte Heilungsprozess beginnt (V). Dabei können körpereigene Zellen in die Poren hineinwachsen, bioaktive Substanzen (z. B. Wachstumsfaktoren) aus dem Gerüstmaterial austreten und den Knochenaufbau unterstützen. Zeitgleich wird das bioresorbierbare Gerüst vom Körper abgebaut und final bleibt nur der neugebildete, natürliche Knochen zurück.

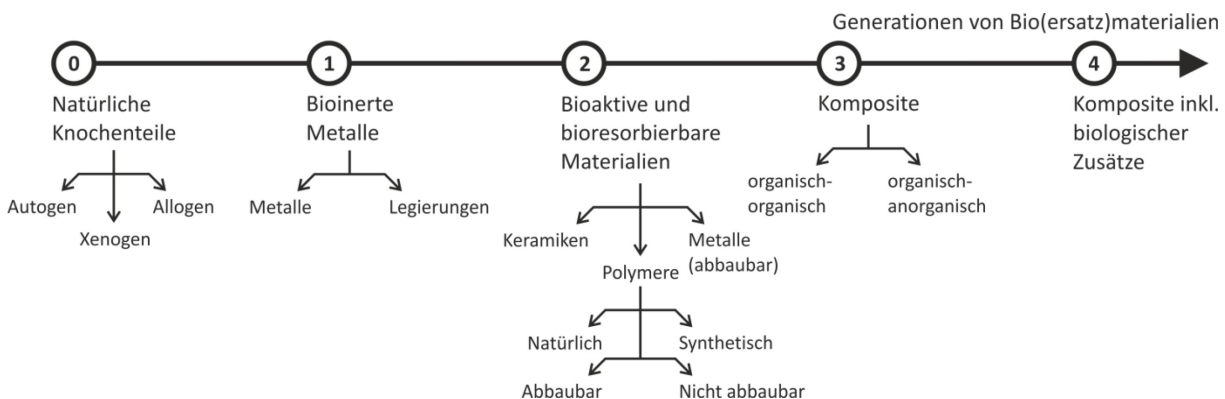
### 2.1.2.1 Klassifizierung synthetischer Biomaterialien

Durch die begrenzte Verfügbarkeit von natürlichen Knochenimplantaten besteht die Notwendigkeit, künstliche Biomaterialien zu entwickeln, die den natürlichen Vorbildern in ihren Eigenschaften mindestens ebenbürtig sind. Die verbreitetsten Rohstoffe für synthetische Biomaterialien sind solche, die sich zu porösen Gerüsten verarbeiten lassen, um später ausreichend von Blutgefäßen durchzogen werden zu können. Die

Tatsache, dass vorwiegend Materialien verwendet werden, die entweder in natürlichem Knochen vorkommen oder für Prozesse der additiven Fertigung geeignet sind, limitiert die Materialenauswahl.<sup>[25]</sup>

## a) Erste Generation

Die Entwicklung der Ersatzstoffe für den Knochenersatz lässt sich in verschiedene Generationen einteilen (Abbildung 4).<sup>[19]</sup> Als Generation Null gelten die Strategien, bei denen Knochenteile vom Patienten selbst (autogen), sterilisierte Teile von anderen Menschen (allogen) oder von Tieren (xenogen) eingesetzt werden. Die erste Generation synthetischer Knochenimplantate, die auch heutzutage noch klinisch verwendet wird, obwohl sie nicht alle zuvor genannten Anforderungen erfüllt, sind bioinerte Materialien. Sie ermöglichen lediglich die Stabilität für die Regeneration.<sup>[26]</sup> Neben allgemein bekanntem, (austenitischem) rostfreiem Stahl und Titan kommen auch diverse Legierungen als Metallimplantate zum Einsatz. Problematisch ist an dieser Strategie, dass diese Art von Implantaten häufig wieder operativ entfernt werden müssen. Sie sind nicht in der Lage vom Organismus abgebaut zu werden und auch die Imitation von knochenähnlichen Nanostrukturen, die aus bereits genannten Gründen von Bedeutung sind, ist schwer zu realisieren.



**Abbildung 4: Generationen von Bio(ersatz)materialien für den Einsatz als Gerüste zur geführten Knochenregeneration.**

## b) Zweite Generation

Die zweite Generation setzt auf den Einsatz von bioaktiven und bioresorbierbaren Stoffen. Der Vorteil hierbei ist, dass kein zusätzlicher operativer Eingriff erforderlich ist, um das Material nach der Heilung wieder zu entfernen. Der Organismus kann es selbstständig abbauen und verstoffwechseln. Hierzu gehören Keramiken, Polymere und abbaubare Metalle. Die anorganischen Keramiken in der Knochenersatztherapie

enthalten fast ausschließlich Calcium- und Phosphatspezies, weil dies die Grundbestandteile der mineralischen Knochenphase sind. Damit sind in der Regel die osteokonduktiven und resorbierbaren Eigenschaften sichergestellt.<sup>[27]</sup> Die wichtigsten Vertreter sind das bereits erwähnte Hydroxylapatit (HA), das Tricalciumphosphat (TCP) sowie die Di-, Tetra- und Octacalciumphosphate. Die prominenteste Ausnahme stellt das Bioglas dar. Hierbei handelt es sich um ein siliziumbasiertes, glasartiges Material, das mit Ionen wie  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  oder  $\text{Al}^{3+}$  sowie Phosphorspezies versetzt ist. Als anorganische Stoffe besitzen die Keramiken außerdem die nötige Steifigkeit, die wiederum direkt an den größten Nachteil gekoppelt ist: Die Keramiken sind zu spröde für tragende Anwendungen.

Die polymeren Vertreter zeigen den gegenläufigen mechanischen Trend. Sie weisen die nötige Zähigkeit für Einsätze unter Belastung auf, sind aber insgesamt zu weich. Es gibt natürliche Polymere wie Kollagen, Gelatin und Hyaluronsäure, die besonders wegen ihrer biologischen Erkennungseigenschaften verwendet werden und zu besserer Zelladhäsion und -differenzierung beitragen.<sup>[19]</sup> Polysaccharide wie Stärke, Alginate, Chitosan und Proteine wie Fibrin fungieren als bioaktive Zusätze oder werden als Gelbildner für 3D-Zellkulturen verwendet. Auch synthetische Polymere sind weit verbreitet. Es mangelt diesen aber meist an Bioaktivität. Das schließt sie als reine Strukturgeber als Implantatmaterial aber nicht aus, weil sie dafür ausreichend verfügbar und gut zu verarbeiten sind.

Zu den neueren Materialien der zweiten Generation gehören auch abbaubare Metalle wie Magnesium und dessen Legierungen. Magnesium wird unter Hydroxidbildung in wässriger Umgebung zersetzt. In diesem Zusammenhang sind die zu hohe Abbaugeschwindigkeit und der entstehende Wasserstoff problematisch. Um die Degradationsraten zu beeinflussen, wird Magnesium z. B. mit Aluminium und Zink legiert.<sup>[28]</sup> Auch die temporäre Passivierung der Oberfläche durch die Fluorierung zu  $\text{MgF}_2$  ist eine vielversprechende Strategie diesen Prozess zu verlangsamen, um die mechanische Integrität länger aufrechtzuerhalten. Die aufgebrachte Schicht aus  $\text{MgF}_2$  ist selbst nicht toxisch und erhöht die Korrosionsresistenz des Magnesiums erheblich.<sup>[29]</sup>

### **c) Dritte Generation**

Die mechanischen Defizite von Keramiken und Polymeren sowie die limitierte Prozessierbarkeit führten dazu, dass Materialien der dritten Generation entwickelt wurden, die alle positiven Eigenschaften vereinen. Der Entwicklungsfokus liegt

deswegen auf Kompositmaterialien.<sup>[30]</sup> Dabei handelt es sich um Verbundwerkstoffe aus zwei oder mehr Komponenten, die durch ihre Verbindung neue Materialeigenschaften hervorbringen.<sup>[31]</sup> Nur durch sie sind die hohen Anforderungen an Leistung, Effizienz und Sicherheit im Alltag zu realisieren. In der regenerativen Medizin sind auf Grund der gewünschten Eigenschaften wie Stabilität, Abbaubarkeit oder Wirkstofffreisetzung vorwiegend organisch-anorganische Komposite bedeutend. Diese Materialien gelten als vielversprechend, weil auch natürlicher Knochen in diese Kategorie fällt. Des Weiteren erhöht der allgemeine Fortschritt in der Nanotechnologie die Wahrscheinlichkeit erheblich, passende synthetische Analoga zu entwickeln. Sie versprechen die Kombination aus Bioaktivität, Resorbierbarkeit und mechanischer Stärke (Härte, Steifigkeit, E-Modul) bei anhaltender Flexibilität (Zähigkeit).

Kommerzielle Systeme basieren meist auf natürlich extrahiertem Kollagen, welche weder die mechanischen Ansprüche erfüllen, noch Allergien oder Übertragungen von Krankheitserregern ausschließen können.<sup>[19]</sup> Meist sind Kombinationen aus den Materialien vertreten, die schon in der zweiten Generation vorgestellt wurden. Diverse keramische Partikel wie HA, TCP oder Bioglas werden in Gele, Kunststoffe, Kollagen und andere Biopolymere eingebracht.<sup>[32]</sup>

#### **d) Vierte Generation**

Die vierte Generation stellt sich als direkte Erweiterung der vorherigen Generation dar. In diesem Fall werden den Kompositen weitere, meist biologische Bestandteile hinzugefügt, um eine natürliche Funktion zu ermöglichen. Dabei kann es sich um lebende, knochenbildende Zellen oder um Wachstumsfaktoren handeln. Letzteres sind Stoffe, die Signale an oder zwischen Zellen übermitteln, wodurch die Produktion von Gewebe angeregt wird. Der Übermittlungsprozess geschieht in der Regel durch Bindungsvorgänge, bei denen Proteine an Zellen oder Zellen auf Oberflächen adhärieren. Auch das verdeutlicht die Wichtigkeit der selektiven Bindung von Biomolekülen an Oberflächen (Kapitel 2.2). Im Fall der Knochenregeneration sind knochenmorphogenetische Proteine (engl. *bone morphogenetic proteins*, BMPs) häufig verwendete Zusatzstoffe, die den Heilungsvorgang unterstützen. BMPs sind multifunktionale Signalgeber natürlichen oder rekombinanten Ursprungs mit klinischer Zulassung.<sup>[33]</sup> Es gibt auch Ansätze diese sehr teuren, empfindlichen Signalproteine durch kürzere Oligopeptide mit ähnlicher Funktion zu ersetzen.<sup>[34]</sup> Die Wirkweisen und

Zusammenwirkungen dieser neuartigen „Allzweck“-Komposite sind sehr komplex und die Ansätze zu deren Optimierung noch sehr rational.

### 2.1.2.2 3D-Strukturen für die regenerative Medizin

Die Erforschung von Zellkulturen in 3D-Strukturen ist für Anwendungen in der regenerativen Medizin entscheidend, weil sie zu komplett anderen Ergebnissen als übliche zweidimensionale (2D-)Kulturen führen können. Zusammensetzungen, die auf 2D-Nährbodenplatten gute Resultate erzielten, scheiterten bspw. anschließend bei teuren und aufwendigen In-vivo-Studien im dreidimensionalen, natürlichen Gewebe.<sup>[35]</sup> Erst 3D-Kulturen können wichtige Informationen über anwendungsnahe Zellmigration liefern und die natürliche extrazelluläre Mikroumgebung simulieren.<sup>[36]</sup> Auch die Vaskularisierung ist nur in 3D-Volumina zu beobachten.<sup>[37]</sup> Konventionelle Techniken wie die Aufschäumung von Polymernetzwerken mit Inertgasen, die Auswaschung von Zucker- oder Salzkristallen aus nichtlöslichen Volumenkörpern und die thermisch induzierte Phasenseparation (TIPS) sind für die Herstellung von porösen, dreidimensionalen Körpern geeignet (Abbildung 5).<sup>[38]</sup> Auch die Gefriertrocknung von gelösten oder dispergierten Netzwerkstrukturen liefert 3D-Körper mit statistischer Porendurchmesserverteilung im Bereich von wenigen hundert Mikrometern, die für Zellbesiedlung und Knochenwachstum genutzt werden.<sup>[39]</sup> Die Trocknung von dispergierten Strukturen unter überkritischen Bedingungen (engl. *supercritical fluid processing*, SCF-Verarbeitung) bspw. im Sol-Gel-Prozess führt zu hochporösen Aerogelen.<sup>[40]</sup> Diese Wege liefern zwar die notwendigen, offenen Strukturen, sind preiswert und skalierbar.<sup>[41]</sup> Sie ermöglichen aber keine Kontrolle über die Strukturierung auf Nano- oder Mikroebene.

Die Herstellung von 3D-Gerüsten wird neben dem Begriff 3D-Druck auch als additive Fertigung (engl. *Additive Manufacturing*) bezeichnet, was das Prinzip des schichtweisen Aufbaus der Strukturen zum Ausdruck bringt. Ab dem Jahr 2004 wurden durch (Bio-)Laserdruck,<sup>[42]</sup> Stereolithographie (engl. *stereolithography (apparatus)*, SLA) und 3D-(Bio-)Plotten zellhaltige Konstrukte prozessiert.<sup>[43]</sup> Aber erst 2010 wurde das erste 3D-gedruckte Produkt für In-vivo-Versuche eingesetzt.<sup>[44]</sup>

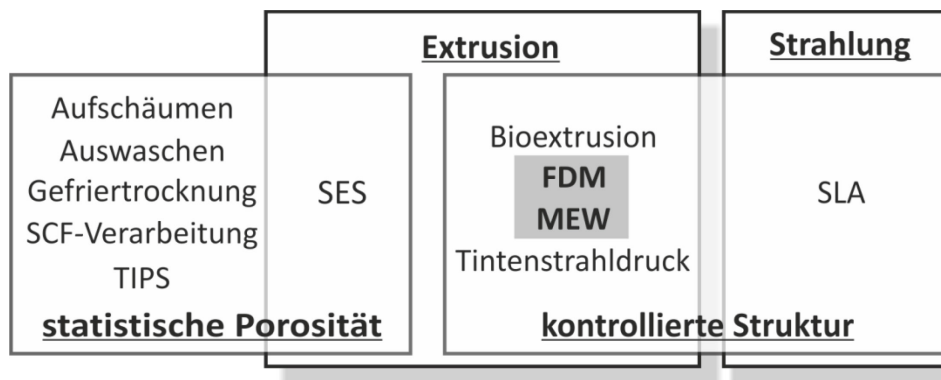


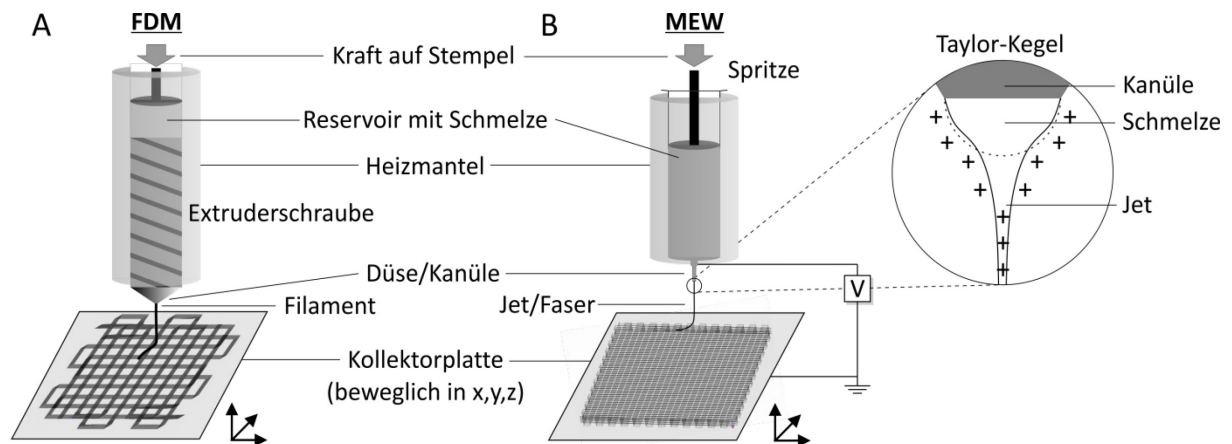
Abbildung 5: Übersicht über ausgewählte Verfahren zur Herstellung von porösen Volumenkörpern für Knochenersatzmaterialien mit Unterteilung nach Art der Porosität in den hergestellten Strukturen (statistische vs. kontrollierte Porenstruktur) und nach Prinzipien des 3D-Drucks (extrusions- vs. strahlungs-basierten Techniken). Abkürzungen: FDM (engl. *fused deposition modeling*, Schmelzschichtung), SCF (engl. *supercritical fluid*-, überkritische Flüssigkeits-), MEW (engl. *melt electrospinning writing*, Schmelzelektrospinnen im Schreibmodus), SES (engl. *solution electrospinning*, Lösungelektrospinnen), SLA (engl. *stereolithography (apparatus)*, Stereolithographie), TIPS (engl. *thermally induced phase separation*, thermisch induzierte Phasenseparation).

Die additiven Fertigungsverfahren ermöglichen komplexe Strukturen, die durch Spritzguss nicht zugänglich sind und können durch computergestützte Gestaltung (engl. *computer-aided design*, CAD) strukturell kontrolliert hergestellt werden. Diese Kontrolle über die externe und interne Struktur kann in der regenerativen Medizin zur geführten Geweberegeneration genutzt werden, um Zellen und neuem Geweben eine Orientierung vorzugeben.<sup>[45]</sup> Dadurch ist es möglich, eine möglichst naturähnliche, extrazelluläre Umgebung zu schaffen.<sup>[46]</sup> Die Kombination aus CAD mit bildgebenden Tomographie-Methoden ebnet als sog. *rapid prototyping* (dt. „schnelle Modellbau“-) Verfahren den Weg in eine personalisierte Medizin, bei der für jeden Patienten individuelle Implantate hergestellt werden können.

Die Herstellungsmethoden für poröse Volumenkörper können anhand verschiedener Aspekte eingeteilt werden. Beispielsweise kann die Porenstruktur (statistisches vs. kontrolliertes Porennetzwerk) oder die Methode zum Aufbau des 3D-Gerüsts (extrusionsbasiert vs. strahlungsinitiiert) jeweils ein Kriterium sein (Abbildung 5). Die Methoden, die verschiedene Materialien als Schmelzen, Gele oder Pasten extrudieren, sollen in dieser Arbeit im Fokus stehen.

Eine der am frühesten entwickelten Methoden ist die Schmelzschichtung (FDM), bei der eine Polymerschmelze über Extruderschnecken transportiert und durch eine Düse einstellbaren Durchmessers extrudiert wird. Der schichtweise Aufbau in kontrollierte Strukturen erfolgt durch die Kopplung mit einer in x, y, z-Richtung beweglichen Kollektorplatte (Abbildung 6 A). Der Materialzufluss aus einem temperierten Reservoir

wird je nach Aufbau über Gasdruck oder Schrittmotoren geregelt. Das FDM hat den Vorteil, dass Schmelzen durch relativ große Düsendurchmesser prozessiert werden können, was das Verstopfen bei inhomogenen Materialien wie z. B. Kompositen reduziert. Außerdem werden relativ robuste Filamente gedruckt, die mit einigen hundert  $\mu\text{m}$  im Durchmesser stabile Strukturen ergeben.



**Abbildung 6:** Schema zum Aufbau und zur Funktionsweise von FDM und MEW: (A) Beim Schmelzschichten (FDM) werden Polymerschmelzen mit Hilfe einer Extruderschraube durch eine Düse extrudiert. (B) Beim Schmelzelektrospinnen (MEW) wird eine Spannung zwischen Kanüle und Kollektor angelegt. Durch elektrische Abstoßung wird die Oberflächenspannung der Schmelze überwunden, ein Taylor-Kegel entsteht (siehe Vergrößerung) und ein Polymer-Jet bildet sich, der die Ablage von dünnen Polymerfasern ermöglicht. Bei beiden Methoden wird durch eine externe Kraft (Gasdruck oder Schrittmotor) kontinuierlich Material aus dem temperierten Reservoir zugeführt, während die Kollektorplatte computergesteuert in alle drei Raumrichtungen steuerbar ist.

Diese Technik ist allerdings in der erreichbaren Druckauflösung begrenzt. Weil die Nanostrukturierung von Gewebeersatzmaterialien für die Zellbesiedlung aber von großer Bedeutung ist, wurde mit dem Lösungselektrospinnen (engl. *solution electrospinning*, SES) eine Methode für die Verarbeitung von Nanofasern entwickelt.<sup>[47]</sup> Das SES hat sich schnell zur meist genutzten Technik zur Fertigung von 3D-Netzwerken im *Tissue Engineering* entwickelt.<sup>[48]</sup> Dabei wird durch das Anlegen einer Spannung zwischen dem Auslass einer Spritze und einer leitfähigen Kollektoroberfläche die austretende Lösung elektrisch aufgeladen. Diese Ladungen lassen abstoßende Kräfte entstehen, die die Oberflächenspannung überwinden, wodurch ein sog. Taylor-Kegel geformt wird (Abbildung 6 B), der statt der üblichen Tropfenbildung einen Polymer-Jet entstehen lässt. Auf dem Weg zwischen Spritzendüse und Kollektor verdampft das Lösungsmittel und dünne Polymerfasern werden als ungeordnete Polymernetze abgelegt. Durch die Erprobung zahlreicher Zusammensetzungen von teilweise bioaktiven oder funktionalisierten Polymeren und Polymermischungen in verschiedenen Lösungsmitteln bzw. -gemischen entwickelte SES sich in wenigen Jahren

zu einer preiswerten und leistungsstarken Methode.<sup>[49]</sup> Bleibende Nachteile dieser Methode sind jedoch die unkontrollierte Ablage der Fasern und die geringe mechanische Stabilität der feinfaserigen Netze.

Eine als Nahfeld-Elektrospinnen (engl. *near-field electrospinning*, NFES) bekannte Weiterentwicklung des SES ermöglicht zwar eine kontrolliertere Faserablage, sie benötigt jedoch meist noch die Verwendung von gesundheitsschädlichen Lösungsmitteln und kann im direkten Schreibmodus den typischen Schleuder-Effekt (engl. *whipping*) des SES nicht komplett eliminieren.<sup>[50]</sup> Die nächste Stufe der Entwicklung stellt das vor etwa zehn Jahren vorgestellte Schmelzelektrospinnen dar, das im direkten Schreibmodus auch mit MEW (engl. *melt electrospinning writing*) abgekürzt wird (Abbildung 6).<sup>[51]</sup> Die Funktionsweise entspricht mit einer angelegten Spannung der des SES. Im Gegensatz zum SES werden dabei Schmelzen verarbeitet, was eine zusätzliche äußere Heizapparatur erfordert. Das MEW überwindet die zuvor genannten Nachteile und liefert Fasern mit Durchmessern zwischen etwa 1-40 µm,<sup>[52]</sup> welche damit mechanisch belastbarer sind als SES-Fasern. Mittlerweile lassen sich durch MEW auch Faserdimensionen im Submikrometer-Bereich erzielen.<sup>[53]</sup> Beispiele aus der aktuellen Forschung nutzen Kombinationstechniken, die verschiedene Druckmethoden vereinen.<sup>[25, 54]</sup> Mit Hilfe dieser Möglichkeit zum Druck von lebendigem Gewebe ließ sich bereits ein funktionsfähiges, bionisches Ohr herstellen.<sup>[55]</sup> Kombinationen von dickeren FDM-Filamenten mit feinen SES- oder MEW-Fasern vereinen mechanische Stabilität mit zellunterstützenden, großen spezifischen Oberflächen.<sup>[56]</sup>

Neben den Extrusionstechniken gibt es in der additiven Fertigung des Weiteren strahlungsgesteuerte Methoden. Diese zeichnen sich durch besonders hohe Druckauflösungen aus, welche sich durch den Einsatz von fokussierten Strahlen oder Lasern realisieren lassen. Die älteste Variante, die aus der Kombination von 2D-basierten Entwicklungen mit Photopolymerisationen entstanden ist, ist die Stereolithographie (engl. *stereolithography (apparatur)*, SLA) und geht bis in die 1970er Jahre zurück. Genau wie bei den meisten anderen strahlungsbasierten Techniken wird ein Laser oder ein fokussierter Lichtstrahl genutzt, um ein photoreaktives Harz nach einer CAD-Vorlage Schicht für Schicht von unten nach oben auszuhärten.<sup>[57]</sup> Die Struktur ist auf einer Hebebühne gelagert, die sich schrittweise immer weiter von der Strahlungsquelle entfernt.

Obwohl 3D-gedruckte (zellfreie) Implantate bereits medizinisch zugelassene Hilfsmittel sind, steht der Bio-3D-Druck noch am Anfang seiner Entwicklung.<sup>[58]</sup>



Insgesamt ist die Auswahl an Materialien, die für den 3D-Druck zur Verfügung stehen, sehr eingeschränkt. Manche Methoden können nur bestimmte Materialklassen verarbeiten, keine lebenden Zellen prozessieren und liefern zu geringe Auflösungen bzw. zu schwache Strukturen oder zu raue Oberflächen. Die Anforderungen an die zu verdruckenden Materialien sind hoch. Meist bedarf es sehr homogener Produkte, um Verstopfungen der Apparaturen zu verhindern und einen kontinuierlichen Druckprozess zu gewährleisten. Auch Prozesse wie Sedimentation, Agglomeration und Phasentrennung müssen unterbunden werden, um homogene Druckresultate zu erzielen.

Innerhalb dieser Arbeit soll der Fokus auf der Optimierung und der Verarbeitung von Polymerkompositschmelzen liegen, um die Bandbreite an druckbaren Biomaterialien zu erweitern. Als Methoden sind hierbei FDM und MEW gewählt worden. Beide Methoden verarbeiten die Rohprodukte aus der Schmelze. Das erübrigt den Einsatz von häufig gesundheitsschädlichen, organischen Lösungsmitteln bei der Prozessierung. Außerdem können beide Techniken im direkten Schreibmodus betrieben werden, um so genaue Kontrolle über die Struktur, Faserausrichtung und Porosität zu erlangen. FDM bietet eine robuste Plattform für den Druck von Polymerfilamenten mit Durchmessern von einigen hundert  $\mu\text{m}$ . Durch sehr variable Düsendurchmesser wird die Gefahr von Verstopfungen minimiert. Damit hergestellte Gerüste bringen gute mechanische Stabilität für tragende Anwendungen im Knochenersatz mit. Die gut handhabbaren Strukturen eignen sich für viele Analysemethoden, die Einblicke in die Struktur-Eigenschaft-Beziehungen der neuen Materialien geben. Einen komplementären Weg die Auflösungsgrenze des FDMs von ca. 50  $\mu\text{m}$  zu unterschreiten, bietet das MEW.<sup>[59]</sup> Hierbei sind Submikrometer-Fasern möglich, die Porositäten um 90% zulassen, was im Bereich der schwammartigen Knochenteile rangiert.<sup>[52]</sup> Das vergrößert die bioaktive Oberfläche und erleichtert Zelladhäsion und -proliferation.<sup>[60]</sup> Mit beiden Bioextrusionsmethoden konnte ausgehend von reinem Polycaprolacton bereits die Eignung für In-vivo-Einsätze demonstriert werden.<sup>[61]</sup>

## **2.2 Ansatz für neuartige 3D-Komposite für den Knochenersatz**

Dieses Kapitel thematisiert sowohl die Unterscheidung der Grenzflächenstabilisierung in Lösung und in Kompositmaterialien als auch die Auswahl der verwendeten Komponenten in dieser Arbeit. Zu Anfang wird die Notwendigkeit der Stabilisierung der Partikeladditive begründet. Nachfolgend wird auf den bioabbaubaren Charakter der Polymermatrix und den bioinspirierten Ansatz eingegangen, mit dem die materialinternen Grenzflächen stabilisiert und kompatibilisiert werden sollen.

### **2.2.1 Stabilisierung von Partikeln in Lösung**

#### **2.2.1.1 Kolloide und Nanopartikel**

Kolloide sind definiert als Dispersionen von Teilchen in einem umgebenden Medium.<sup>[62]</sup> Der Ausdruck stammt vom griechischen  $\kappa\omicron\lambda\lambda\alpha$  (dt. Leim), der auf die häufig trübe, zusammenhängende Beschaffenheit Bezug nimmt. Die dispergierten Teilchen können fester, flüssiger oder gasförmiger Natur sein und sich in festen, flüssigen oder gasförmigen Medien befinden. Alltagsbeispiele für kolloidale Systeme sind Nebel (flüssig/gasförmig), Milch (flüssig/flüssig) und Dispersionsfarben (fest/flüssig). Erste Definitionen als Stoffe, die durch Membranen diffundieren können, stammen von Graham aus dem Jahr 1961, der als "Vater der Kolloide" gilt.<sup>[63]</sup> Die aktuelle Definition der IUPAC schließt weitere Eigenschaften ein. Demnach sind Kolloide Stoffe, die in mindestens einer Dimension eine Ausdehnung von 1 bis 1000 nm besitzen und eine gleichmäßige Verteilung aufweisen, welche sich im Mittel in einem bestimmten Zeitraum nicht verändert.<sup>[64]</sup> Eine Besonderheit der Kolloide ist das hohe Verhältnis von Oberfläche zu Volumen. Auf Grund ihrer geringen Größe überwiegen die Oberflächeneffekte gegenüber den Festkörpereigenschaften. Dies ermöglicht interessante Vorgänge an der Grenzfläche zwischen Teilchen und Medium. Im Größenbereich der Kolloide sind die Teilchen der Brownschen Bewegung unterworfen, weswegen sie in der Regel nicht oder nur langsam sedimentieren.<sup>[64]</sup>

Die Begriffe Kolloid und Nanopartikel werden in der Literatur häufig nicht genau unterschieden. Ausgehend von der Definition dürfen Nanopartikel in mindestens zwei Dimensionen 100 nm nicht überschreiten.<sup>[65]</sup> Demnach fallen sie in die Klasse der

Kolloide, verdienen jedoch die Abgrenzung in eine separate Kategorie. Nanopartikel zeigen oft andere mechanische,<sup>[66]</sup> magnetische,<sup>[67]</sup> katalytische,<sup>[68]</sup> optische und kristallographische Eigenschaften als ihre korrespondierenden Festkörper bzw. Partikel größerer Durchmesser.<sup>[69]</sup> Bei einem Großteil der sog. Nanopartikel werden die neuen Eigenschaften allein durch das hohe Oberfläche-zu-Volumen-Verhältnis bestimmt, ohne dass der Größenquantisierungseffekt ausschlaggebend ist.<sup>[70]</sup> Die kleinen Kolloide besitzen hochenergetische Oberflächen und weisen Krümmungen und Fehlstellen auf. In vielen Anwendungen sind kleinere Partikel zu bevorzugen, weil bei gleicher Masse mehr Partikel zur Verfügung stehen, was einen effektiveren Einsatz ermöglicht, z. B. indem eine bessere Verteilung im Material erreicht wird.

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Stabilisierung von kolloidalen Suspensionen von Interesse. Suspensionen bestehen aus festen Partikeln in einem flüssigen Medium, denen es in vielen Fällen an chemisch-physikalischer Stabilität (z. B. bei Änderungen der chemischen Umgebung) oder an Langzeitstabilität mangelt. Diese festen anorganischen Bestandteile können durch ihre hohe Härte u. a. dazu genutzt werden, die elastischen Moduln von Polymer-Verbundmaterialien zu erhöhen. Dabei ist zum einen die Stabilisierung der Partikel sinnvoll, da durch geringere Partikelgrößen bessere Dispersitäten in den Polymer-Kompositen erreicht werden können. Zum anderen sollte durch eine Verbindung der unterschiedlichen Komponenten in diesen Verbundstoffen der Effekt der Füllstoffe verbessert werden. Dies wird im Folgenden als Kompatibilisierung der Additive im umgebenden Matrixpolymer bezeichnet und kann sich positiv auf deren mechanische Eigenschaften auswirken.

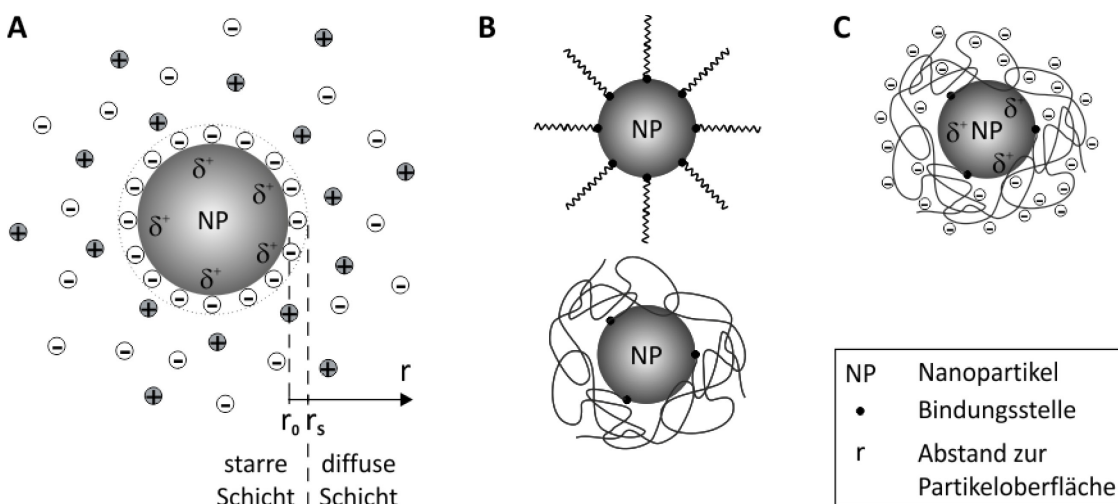
### **2.2.1.2 Mechanismen der Stabilisierung**

Die Partikel in kolloidalen Suspensionen weisen durch ihre geringe Größe vergleichsweise viele Oberflächenatome auf. Diese sind im Gegensatz zu Atomen im Festkörper nicht komplett abgesättigt. Dadurch sind die Oberflächen kleiner Partikel weniger stabil und neigen zur Koagulation, also zu Aggregation oder Agglomeration. Für die Nutzung der Kolloide in verschiedensten Anwendungen ist es daher hilfreich, existierendes Wissen über Stabilisierungsmechanismen in kolloidalen Suspensionen direkt in das Design von neuen Stabilisatoren einfließen zu lassen. Die Stabilität von Kolloiden wird thermodynamisch durch die Änderung der Freien Enthalpie  $dG$

beschrieben, die in Abhängigkeit der Oberflächenspannung  $\gamma$  und der Änderung der Oberfläche  $d\sigma$  in Gleichung 1 gezeigt ist.<sup>[62]</sup>

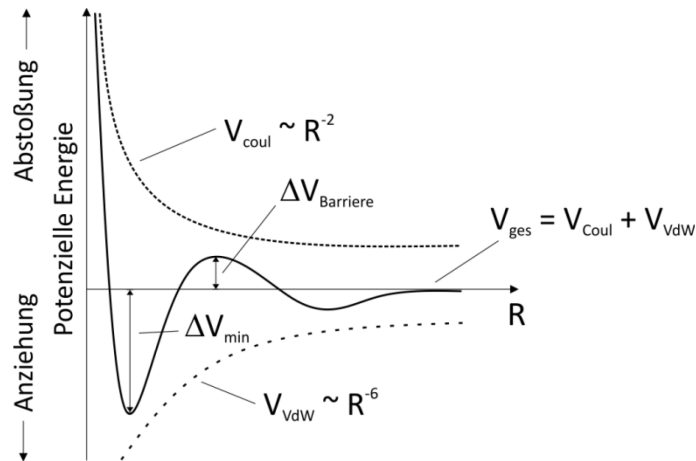
$$dG = \gamma d\sigma \quad (\text{Gleichung 1})$$

Mit abnehmender Partikelgröße wird  $d\sigma$  negativ, was eine Abnahme der Freien Enthalpie zur Folge hat. Ein negatives  $dG$  bedeutet allerdings, dass ein chemischer Prozess (bei konstanter Temperatur und konstantem Druck) freiwillig abläuft. Aus rein thermodynamischen Gesichtspunkten dürften demzufolge Nanopartikel nicht über längere Zeiträume stabil sein. Da allerdings Fälle bekannt sind, in denen Kolloide relativ lange lagerfähig sind,<sup>[71]</sup> kann auf eine kinetische Inhibierung geschlossen werden. Diese verhindert trotz negativem  $d\sigma$  eine Koagulation der Partikel.



**Abbildung 7: Schematische Darstellung der Mechanismen zur Nanopartikelstabilisierung: (A) elektrostatisch, (B) sterisch und (C) elektrosterisch.**

Es werden drei Arten von Mechanismen unterschieden, die Grenzflächen in Kolloiden zu stabilisieren. Hierbei wird zwischen (i) elektrostatischer, (ii) sterischer und (iii) elektrosterischer Stabilisierung unterschieden (Abbildung 7).<sup>[72]</sup> Die erste Variante basiert auf der Abstoßung gleicher elektrostatischer Ladungen. Die Kolloidteilchen tragen Ladungen auf ihrer Oberfläche, die ihr Umfeld beeinflussen. Wegen der Anziehung entgegengesetzter Ladungen bildet sich in direkter Nähe der Partikel eine starre Ladungsschicht aus Gegen-Ionen. Um diese unbewegliche Schicht, deren Dicke durch den Scherradius  $r_s$  angegeben wird, lagert sich eine diffuse Schicht aus gegensätzlich geladenen Ionen an. Die Stabilisierung basierend auf diesen Ladungsdoppelschichten wurde von Derjaguin, Landau, Verwey und Overbeek in der nach ihnen benannten DLVO-Theorie beschrieben (Abbildung 8).<sup>[73]</sup>



**Abbildung 8: Potenzielle Energie  $V$  der Wechselwirkung zwischen zwei geladenen Teilchen mit Abstand  $R$  nach der DLVO-Theorie als Kombination aus abstoßenden und anziehenden Kräften.**

Diese behandelt die Partikel als starre Kugeln mit gleichmäßiger Ladungsverteilung, die sich auf Grund der Coulomb-Wechselwirkungen  $V_{\text{Coul}}$  abstoßen und durch van-der-Waals-Wechselwirkungen  $V_{\text{vdW}}$  anziehen. Je nach Abstand der Mittelpunkte beider Kugeln  $R$  variiert die summierte Energie  $V_{\text{ges}}$  und tendiert je nach Vorzeichen von  $V_{\text{ges}}$  zu Anziehung oder Abstoßung bzw. zu Destabilisierung oder Stabilisierung. Das Gesamt-Potenzial weist in Abhängigkeit von  $R$  ein primäres Minimum mit  $\Delta V_{\text{min}}$  und ein lokales Maximum mit  $\Delta V_{\text{Barriere}}$  auf. Je höher die letztere Energiebarriere ausfällt, desto kinetisch stabiler sind die Kolloide. Die Art und Anzahl der Ionen im umgebenden Medium haben ebenso einen Einfluss auf die Abstoßung wie die Oberflächenladung der Partikel. Ein Maß für letzteres ist das Zeta ( $\zeta$ )-Potenzial, welches in etwa dem elektrischen Potenzial auf Höhe des Scherradius' relativ zum Potenzial des Lösungsmittels entspricht.<sup>[64]</sup> Soll dieses Prinzip zur Kolloidstabilisierung genutzt werden, muss das  $\zeta$ -Potenzial erhöht (z. B. durch Erhöhung des pH-Werts) oder die Ionenstärke niedrig gehalten werden.<sup>[64, 74]</sup> Die klassische DLVO-Theorie betrachtet allerdings nur Dipol- und elektrostatische Wechselwirkungen und beschreibt damit nur einen Teil der Gründe für Partikelstabilitäten.

Die sterische Stabilisierung der Nanopartikel erfolgt durch die Belegung der Partikel mit Molekülen, welche verhindern, dass die hochenergetischen Oberflächen wechselwirken.<sup>[75]</sup> Der pH-Wert, die Größe der Moleküle, ihre Geometrie und die Art sowie Stärke der Wechselwirkungen mit der Partikeloberfläche beeinflussen die Effektivität der Beschichtung und damit der Stabilisierung. Die Moleküle können auf verschiedene Weise an die Partikel gebunden sein, die sich in der Stärke der Wechselwirkungen unterscheiden. Ein prominentes Beispiel sterischer Stabilisatoren sind Tenside, die sich mit ihren geladenen Kopfgruppen an die Partikel anlagern und

durch ihre längeren, organischen Reste eine Abschirmung verursachen. Häufig werden auch Makromoleküle in Form von Proteinen oder Polymeren für nicht-kovalente Beschichtungen genutzt.<sup>[76]</sup> Kovalente Verknüpfungen bspw. durch Silanisierung können ebenfalls zur Stabilisierung führen.<sup>[77]</sup> Weitere Arbeiten verwendeten koordinative Bindung, die u. a. mit organischen Säuren oder Aminen möglich sind.<sup>[78]</sup>

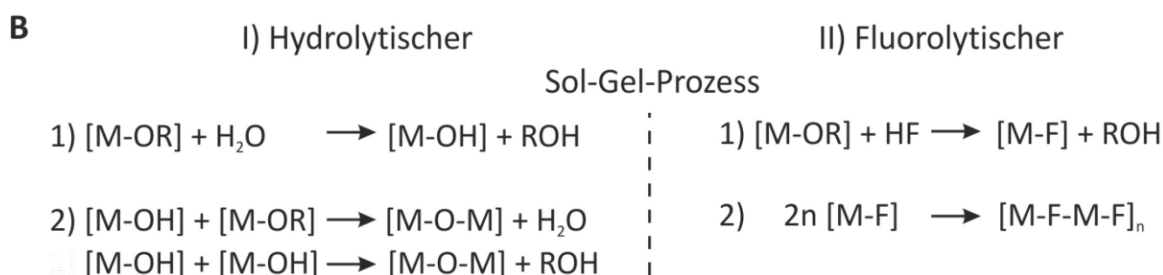
Die dritte Methode zur Stabilisierung basiert auf der Kombination der beiden bereits erläuterten. Geladene Makromoleküle übernehmen hierbei die Aufgabe der Oberflächenmodifikation. Synthetische Polymere, die aus geladenen Monomeren bestehen oder nachträglich funktionalisiert werden, können ebenfalls für effektive Stabilisierungen verwendet werden. Beispiele hierfür sind Poly(acryl)säuren, ungeladene Polymerrückgrate mit ionischen Kopfgruppen oder geladene Copolymere. Diese folgen der Idee der DLVO-Theorie.<sup>[79]</sup>

Am Beispiel von metallhaltigen Kompositen zeigte sich, dass die einfache Mischung von mehreren Komponenten leichter postuliert als realisiert werden kann. Die zu schwache Verbindung von Metall- und Keramikpartikeln ließ daraus bisher keinen erfolgreichen Verbundwerkstoff entstehen.<sup>[16]</sup> Die reine Durchmischung der Einzelbestandteile reicht in diesem Fall nicht aus. Dieser Fall legt nahe, dass eine Kompatibilisierung, d. h. eine Verbindung beider Komponenten auf molekularer Ebene, hergestellt werden muss, um verbesserte Materialeigenschaften zu erzielen. Die besten Ergebnisse werden häufig in natürlichen Verbundstoffen wie bspw. Knochen und Perlmutter festgestellt, die ein hohes Maß an Organisation über mehrere Längenskalen hinweg aufweisen. Die Kontrolle über die innere Struktur synthetischer Materialien, besonders im Nanometerbereich, ist praktisch jedoch schwer zu erreichen. Typische Probleme bei der Herstellung und der Verarbeitung von Mischungen und Verbundwerkstoffen sind die Agglomeration der Partikel, deren Sedimentation, die Phasenseparationen oder die schlechte Verteilungen der Partikel im Matrixpolymer. Gegenmaßnahmen wie das Mischen in Lösung, die Copräzipitation oder die Gefriertrocknung können diese Probleme häufig nicht verhindern.<sup>[80]</sup> Ein erfolgreicher Ausweg kann die gezielte Modifikation der Partikeloberflächen sein, wodurch die materialinternen Grenzflächen stabilisiert und die Wechselwirkungen zwischen Füller und Matrix verstärkt werden.<sup>[81]</sup> Dies stellt auch den zentralen Aspekt der vorliegenden Arbeit dar.

### 2.2.2 Partikelsynthese

Die praktische Anwendung der Mechanismen zur Partikelstabilisierung erfolgt bei etablierten Methoden zur Herstellung von Nanopartikeln. Eine vielgenutzte Möglichkeit, anorganische Partikel und Materialien herzustellen, ist der Sol-Gel-Prozess. Diese mehrstufige Syntheseroute der Festkörperchemie, deren Anfänge bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts zurückzuverfolgen sind,<sup>[82]</sup> ermöglicht die Herstellung neuer Keramiken, die mit traditionellen Methoden nicht zugänglich sind.<sup>[83]</sup> Anfänglich wurden vorwiegend Siliciumoxide untersucht, weshalb Silica-basierte Festkörper zu den am besten verstandenen Systemen gehören, die mittels Sol-Gel-Prozess zugänglich sind. Bis heute liegt der Schwerpunkt der Sol-Gel-Nutzung auf der Herstellung oxidischer Materialien, ist allerdings seit der Jahrtausendwende nicht mehr darauf beschränkt.<sup>[84]</sup> Die Übertragung des Wissens des klassischen, hydrolytischen Sol-Gel-Verfahrens auf anorganische Fluoride eröffnete neue Möglichkeiten zur Darstellung von homodispersen Metallfluoriden. Diese weisen im Vergleich zu den oxidischen Analoga herausragende optische Eigenschaften wie niedrigere Brechungsindizes oder weitere Bereiche optischer Transparenz auf.<sup>[85]</sup> Auch in der Katalyse finden die Metallfluoride mit besonders hoher spezifischer Oberfläche Anwendung als heterogene Katalysatoren mit einstellbarer Säurestärke oder als deren Trägermaterial.<sup>[86]</sup>

Die Stufen der hydrolytischen und der fluorolytischen Sol-Gel-Synthese verlaufen analog zueinander (Abbildung 9). Es liegen allerdings andere chemische Reaktionen zu Grunde. Die Ausgangsstoffe, zu denen meist organische (Halb-)Metallverbindungen oder entsprechende Salze gehören, können bei beiden Wegen grundsätzlich gleich sein. In Abbildung 9 werden Metallalkoxide  $[M-OR]$  für die Erklärung der beiden Sol-Gel-Routen herangezogen ( $M = (\text{Halb-})\text{Metall}$ ,  $R = \text{organischer Rest}$ ). Bei der klassischen Variante, dem oxidischen Sol-Gel-Prozess, wird zur Initiierung der Reaktion Wasser als Sauerstoffquelle hinzugegeben. Durch Hydrolyse entstehen im ersten Schritt Metallhydroxide  $[M-OH]$ , die durch Kondensation mit weiteren Hydroxiden oder Alkoxiden kovalent sauerstoffverbrückte Spezies  $[M-O-M]$  ausbilden. In der neuen fluorolytischen Route ausgehend von Metallalkoxiden wird häufig wasserfrei gearbeitet, um keine oxidische Solbildung zu starten. Die Synthese wird hingegen durch die Zugabe von alkoholischer Fluorwasserstofflösung gestartet. Es bilden sich die entsprechenden Metallfluoride, die sich in Folgereaktionen über Fluorid-Ionen verbrücken. Im gegebenen Beispiel wird bei beiden Prozessen Alkohol frei.



**Abbildung 9: Übersicht über den (I) klassischen, hydrolytischen und den (II) fluorolytischen Sol-Gel-Prozess: (A) Reaktionsschritte beider Varianten der Festkörpersynthese verlaufen analog (nach <sup>[40b]</sup>). (B) Gegenüberstellung der Reaktionsschemata beider Prozesse nach <sup>[87]</sup> (Die Ladung der Metall-Ionen, die daraus resultierende Mehrbindigkeit und damit die Möglichkeit dreidimensionale Netzwerke auszubilden, wird in dieser Darstellung aus Gründen der Übersichtlichkeit vernachlässigt).**

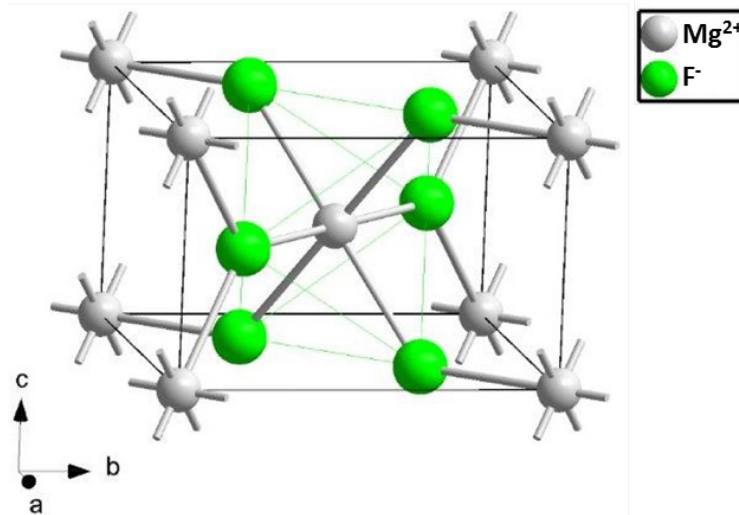
Durch Kondensationen bzw. Fluorid-Verbrückungen formen sich aus gelösten Spezies erst Oligomere, Cluster und später Partikel. Bei geeigneten Reaktionsparametern (pH-Wert, Temperatur, Lösungsmittel, Konzentration der Ausgangsverbindung) können stabile, kolloidale Suspensionen, sog. Sole, hergestellt werden. Durch Alterungsprozesse wie bspw. die Ostwald-Reifung entstehen Teilchen unterschiedlicher Größen. Die Alterung ist ein noch nicht komplett verstandener Vorgang, der sowohl auf Stufe des Sols wie auch auf Stufe des Gels eine Rolle spielt.<sup>[83]</sup> Dabei folgt interessanterweise auf die Entstehung von kinetisch stabilen Partikeln eine Phase, in der die Teilchengrößen wieder abnehmen.<sup>[78b]</sup> Visuell lässt sich dieser Vorgang verfolgen, weil das nach der Fluorierung trübe Sol mit der Zeit optisch aufklart. Die Alterung der Gele ist von Polykondensationen bzw. fortschreitender Verbrückung geprägt, was sich in steigender Viskosität bemerkbar macht. Die Zwischenräume der Netzwerke sind während der nasschemischen Synthese mit Lösungsmittel gefüllt und werden je nach Reaktionsmedium als Hydro- oder Alkogeले bezeichnet. Die Trocknungsmethode entscheidet die Form, in der die Produkte erhalten werden. Bei der überkritischen Trocknung, bei der das Gerüst aus Partikeln erhalten bleibt, können teiltransparente, hochporöse Aerogele erhalten werden. Bei der Entfernung des Lösungsmittels unter nicht-kritischen Bedingungen kollabieren die Netzwerkstrukturen und Xerogele werden in Form von Pulvern gewonnen.



Ein Vorteil des mehrstufigen Sol-Gel-Verfahrens ist, dass die Produkte für verschiedene Anwendungen entweder als Sol oder als Gel prozessiert werden können. Während die Gel-Trocknung unter Normalbedingungen – wie andere Festkörpersynthesen auch – zu gut lagerbaren, trockenen Pulver führt, können die ungetrockneten Gele als stabile Netzwerkstrukturen verwendet werden. Für Oberflächenbeschichtungen zur Härtung oder zur Verbesserung der optischen Eigenschaften bietet sich außerdem die Verwendung der kolloidalen Sole an, in denen die Sol-Partikel noch einen homodispersen, nanoskopischen Charakter aufweisen.<sup>[88]</sup> Um diesen über längere Zeit aufrechtzuerhalten, werden Stabilisatoren eingesetzt, die durch die Modifikation der Oberflächen eine dauerhafte Zusammenballung der Partikel in Suspension verhindern oder verlangsamen. Bei Nanopartikeln, die nach dem Sol-Gel-Verfahren hergestellt werden, findet eine Vielzahl von Oberflächenmodifikationen Anwendung, um langzeitstabile, kolloidale Suspensionen zu generieren. Neben den zuvor beschriebenen (Bio-)Polymeren haben sich kovalente Silanisierungen oder niedermolekulare Säuren als effektive Stabilisatoren erwiesen.<sup>[89]</sup> In die letztere Kategorie zählen Carbon-, Sulfon- und Phosphonsäuren,<sup>[90]</sup> von denen besonders Trifluoressigsäure (*trifluoroacetic acid*, TFA), Perfluorbuttersäure, Phenyl-, Vinyl- und Octylphosphonsäure interessant sind, weil diese bereits erfolgreich  $\text{MgF}_2$  stabilisieren konnten.<sup>[91]</sup> Neben einer Stabilisierung beschleunigen die Säuren die Aufklärung der Sole nach der Fluorierung, indem sie die Deagglomeration unterstützen. Hierfür ist nicht nur die Protonierung der Oberfläche, sondern vorwiegend deren Belegung durch die organischen Säurereste verantwortlich. Die Unterscheidung zwischen den Wechselwirkungen, die bei der Bindung bzw. Adhäsion vorherrschen (kovalent, ionisch oder koordinativ) ist dabei nicht immer trivial.

In dieser Arbeit wurde  $\text{MgF}_2$  als anorganische Komponente gewählt, weil es zu den bestuntersuchten Systemen der fluorolytischen Sol-Gel-Synthese zählt. Erst mit der Entwicklung des wasserfreien, fluorolytischen Sol-Gel-Prozesses wurden monodisperse Metallfluorid-Partikel zugänglich. Im Jahr 2006 wurde zum ersten Mal die Herstellungsrouten des nanoskopischen Sols aus Magnesiummethanolat  $\text{Mg}(\text{OCH}_3)_2$  erfolgreich beschrieben, die ohne den Zusatz von Stabilisatoren auskam.<sup>[92]</sup> Damit können stabile Sole synthetisiert werden, in denen die unmodifizierten Partikeloberflächen noch für weitere Oberflächenmodifikationen zur Verfügung stehen. Das  $\text{MgF}_2$  aus dem Sol-Gel-Prozess unterscheidet sich in der chemischen Zusammensetzung kaum von  $\text{MgF}_2$  aus anderen Herstellungsmethoden wie z. B. der

Fällung aus einer wässrigen  $\text{MgCl}_2$ -Lösung oder der Lösung von metallischem Magnesium in Flusssäure. Der entscheidende Unterschied besteht darin, dass das  $\text{MgF}_2$  durch das gewählte Sol-Gel-Verfahren als hochgestörtes Nanomaterial erhalten wird.<sup>[87]</sup>



**Abbildung 10: Kristallstruktur von  $\text{MgF}_2$  (Rutil-Struktur).**

$\text{MgF}_2$  zeichnet sich durch einen sehr niedrigen Brechungsindex von  $n_{500} = 1.38$  (bei  $20\text{ °C}$ ) aus und weist über einen weiten Spektralbereich eine hohe Transparenz auf, sodass es häufig für antireflektive Beschichtungen oder die Veredlung optischer Bauteile verwendet wird.<sup>[93]</sup> Die  $\text{MgF}_2$ -Solnanopartikel sind neben ihren optischen und katalytischen Eigenschaften auch als Härtungsmittel in Kompositen interessant, da sie im Vergleich zu organischen Polymeren sehr hart sind (Mohssche Härte = 6). Es kristallisiert unter Normalbedingungen im Rutil-Typ (Abbildung 10), die Löslichkeit in Wasser ist mit  $0.13\text{ g L}^{-1}$  niedrig und es ist nicht toxisch.<sup>[94]</sup> Damit eignet es sich als Implantatmaterial, weil es auch bei Langzeitanwendungen unter wässrigen Bedingungen ausreichend stabil ist. Die niedrige Löslichkeit verspricht eine langsame, kontinuierliche Freisetzung von Magnesium- und Fluorid-Ionen. Beide Ionensorten wurden bereits als bioaktive Spezies in biologischen Anwendungen identifiziert, weshalb  $\text{MgF}_2$  auch für biomedizinische Zwecke interessant ist.<sup>[95]</sup>

### 2.2.3 Polymermatrix

Für die erfolgreiche Entwicklung von Kompositmaterialien spielt neben der effektiven Größenstabilisierung der Additive die Auswahl des Matrixpolymers eine zentrale Rolle. Dieses Ausgangsmaterial macht den größten Massenanteil aus und bildet somit die Basis der mechanischen Eigenschaften des finalen Verbundstoffs. Spätestens seit den Bioersatzmaterialien der dritten *Tissue Engineering*-Generation stehen bioabbaubare Polymere im Fokus der Forschung.<sup>[30]</sup> Die Anforderungen wie Biokompatibilität, mechanische Integrität und Verarbeitbarkeit wurden bereits in Kapitel 2.1.2 beschrieben.<sup>[81]</sup> Je nach Anwendung rücken unterschiedliche Eigenschaften in den Vordergrund. Im Bezug auf die Regeneration von Gewebeteilen sind besonders die abbaubaren Polymere Gegenstand aktueller Forschung, weil es die Anzahl nötiger Operationen und damit das Infektionsrisiko der Patienten reduziert.

Die häufigsten Kunststoffe der bioresorbierbaren Klasse sind Polycaprolacton (PCL), Polylactid (engl. *polylactic acid*, PLA), Polyglycolid und entsprechende Copolymere (z. B. PLGA). Diese werden sehr häufig durch Schmelzextrusion und Elektrospinnen verarbeitet, dienen aber auch zur Modifikation von Oberflächen.<sup>[96]</sup> Eine weitere Klasse von Makromolekülen im *Tissue Engineering* sind Polyethylenglykole (PEG), auch oft synonym Polyethylenoxide (PEO), die besonders auf Grund ihrer Löslichkeit bzw. Quellfähigkeit in Wasser eine hervorzuhebende Position einnehmen. Sie dienen u. a. als Oberflächenmodifikatoren zur Immuntarnung, als Löslichkeitsvermittler von Wirkstoffen oder als Gelbildner, bei denen sehr definierte Molekulargewichtsverteilungen einstellbar sind.<sup>[97]</sup>

Nicht physiologisch abbaubare Repräsentanten sind Polymethylmethacrylat (PMMA), Polyetheretherketone (PEEK) und Polyethylen mit ultra-hohem Molekulargewicht (UHMWPE). Diese überzeugen durch ihre mechanischen und bioresistenten Eigenschaften.<sup>[98]</sup> PMMA wird bspw. in Knochenzementen verarbeitet. UHMWPE ist auf Grund einer geringeren Reibung und einer hohen Widerstandsfähigkeit gegen Abrieb und Schläge langzeitstabil. PEEK hingegen ist durchlässig für Röntgenstrahlen, wodurch der Knochenheilungsprozess in situ beobachtet werden kann.<sup>[16]</sup> Die Schnittmenge zwischen den natürlichen und den synthetischen Polymeren bilden Polyalkanoate wie Polyhydroxybutyrat oder Polyhydroxyvalerat, die bakteriell hergestellt werden, sehr wasserunlöslich, aber dennoch bioabbaubar sind.<sup>[19]</sup>

Im Hinblick auf die Herstellung von 3D-Strukturen mit kontrollierter Porosität werden als extrusionsbasierte Techniken vornehmlich Elektrosponnen und FDM (Schmelzschiichtung) verwendet. Eine der verbreitetsten Methoden ist mit dem SES (Lösungselektrosponnen) lösungsmittelbasiert. Dabei kommen meist organische Lösungsmittel zum Einsatz, die die Biokompatibilität der entstehenden Strukturen verschlechtern können. Folglich geht der Trend zu schmelzebasierten Verarbeitungsarten über. Dabei werden meist thermoplastische Polymere verwendet, zu denen auch PCL und PLA gehören. PCL ist noch weniger verbreitet als PLA, da es eine geringere mechanische Steifigkeit aufweist als das Polylactid.<sup>[99]</sup> PLA zeigt in Folgeuntersuchungen allerdings Nachteile. Es ist hydrophober als PCL, was zu einer langsameren Abbaugeschwindigkeit führt. Die Zeit des hydrolytischen Abbaus ist demnach weit länger als die Regenerationszeit des natürlichen Gewebes. Des Weiteren kann es bei der Zersetzung von PLA durch die Abbauprodukte zur lokalen Übersäuerung kommen.<sup>[100]</sup> PCL schmilzt im Gegensatz zum PLA bereits ab ca. 60 °C und lässt sich so bei niedrigeren Temperaturen verarbeiten. Diese kürzeren Abkühlzeiten ermöglichen eine höhere Druckauflösung in 3D-Verarbeitungsprozessen.<sup>[99]</sup> Außerdem wird die thermische Beanspruchung der Additive reduziert. Während der Einfluss der höheren Temperatur auf die anorganischen Partikel zu vernachlässigen ist, wurde mit Blick auf die grenzflächenaktiven Peptid-Polymer-Konjugate in dieser Arbeit PCL als Matrixpolymer gewählt.

## **2.2.4 Bioinspirierte Grenzflächenstabilisierung**

Dieses Kapitel beschreibt einige bisherige Anwendungen von biologischen Strukturen im Bereich der Materialchemie. Der Schwerpunkt liegt hierbei auf der Modifikation von Oberflächen mit Peptiden und Proteinen, was auch den Ursprung der natürlichen Inspiration für die Grenzflächenstabilisierung dieser Arbeit begründet. Der innovative Ansatz dieser Arbeit ist der Ersatz von natürlichen Grenzflächenpolymeren durch synthetisch zugängliche Polymerspezies, die durch oberflächenbindende Eigenschaften eine kompatibilisierende Wirkung entfalten, wodurch komplexere Bioersatzmaterialien zugänglich werden. Dies soll durch die sequenzspezifische Bindung von Peptid-Polymer-Konjugaten auf Partikeln realisiert werden. Hierzu werden der Übergang von der

Grenzflächenstabilisierung zur -kompatibilisierung erläutert und die Herausforderungen der Analyse von Grenzflächenprozessen kurz angesprochen.

#### **2.2.4.1 Oberflächenmodifikationen von Partikeln mit Biomolekülen**

Im alltäglichen Leben werden Beschichtungen verwendet, um Flächen z. B. vor Kratzern, Bruch oder Verwitterung zu schützen, um durch erhöhte Transparenz Lichtverluste zu vermeiden oder um die Haftung weiterer Schichten zu verbessern. Synthetische Produkte werden benutzt, um bspw. optische Bauteile wie Linsen zu beschichten und dadurch die Lichtbrechung zu verringern.<sup>[101]</sup> Zur Verbindung von Werkstoffen, die aus verschiedenen Materialien bestehen, wurden viele Klebstoffe und Haftvermittler entwickelt, die oft speziell auf die jeweilige Anwendung angepasst sind. Neben kommerziellen Cyanoacrylat-basierten Klebstoffen für den Hausgebrauch (sog. Sekundenklebern) wurde u. a. auch das dauerhafte Verbinden von Metall- mit Kunststoffflächen realisiert.<sup>[102]</sup> Dafür eignen sich Haftvermittler aus Polyamid-Polyamin-Copolymeren.<sup>[103]</sup> Letzteres war durch die starken Unterschiede in der Materialbeschaffenheit lange eine große Herausforderung. Auch Patienten profitieren von Beschichtungen aus perfluorierten Kohlenwasserstoffen, die die Oberflächen von Medizinprodukten selbst nach Implantation sauber halten und damit Biofouling und Thrombosen verhindern.<sup>[1a]</sup>

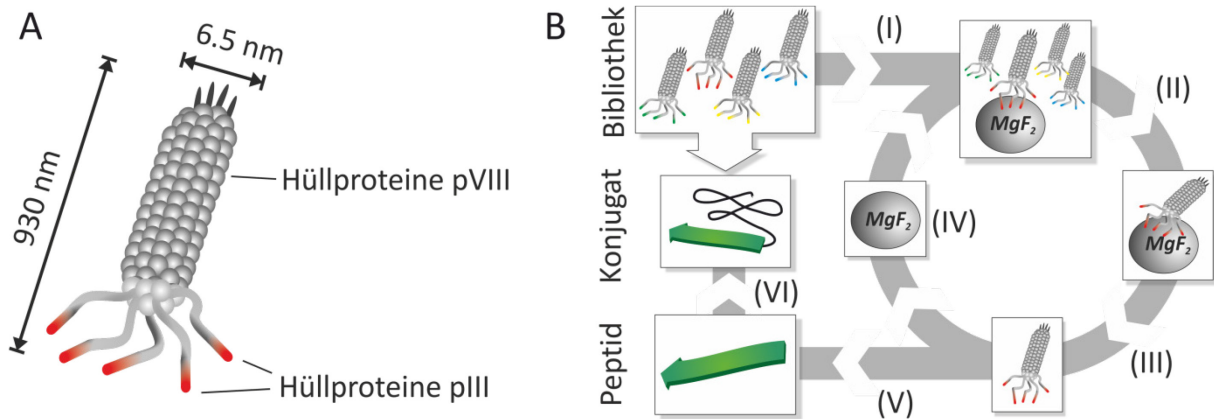
Im industriellen Maßstab sind es allerdings selten Biomoleküle, die zum Einsatz kommen. Ihr Einsatz ist aus Kosten- und Verfügbarkeitsgründen begrenzt. Dazu zählen neben Kohlenhydraten, Lipiden auch Peptide und Proteine. Durch den definierten Aufbau und die sich daraus ergebenden komplexen Strukturen werden biologische Funktionen erst ermöglicht. Beispielsweise werden Informationsübertragungen und daraus resultierende Aktionen über schwache Wechselwirkungen und Chiralität geregelt.<sup>[104]</sup> Nachahmungen dieser Biobeschichtungen führten z. B. zur Entwicklung von Sensoren, die verschiedene Biomoleküle unterscheiden können oder die mikroskopische Bildgebung und damit die Visualisierung von Zellen verbessern.<sup>[105]</sup> Neben den bioaktiven Oberflächen sind auch bioinerte Beschichtungen von Bedeutung. Die Funktionalisierung durch abschirmende Polymere, welche die Wechselwirkungen mit Proteinen, Lipiden, Glycanen und anderen Biomolekülen verringern, erhöht bspw. die Verweilzeiten von Kontrastmitteln im Organismus während der

Magnetresonanztomographie.<sup>[106]</sup> Im Bereich der Oberflächenmodifikationen hat sich die Klasse der Peptide und Proteine für Anwendungen in der Biochemie und den Materialwissenschaften hervorgetan. Sie zeichnen sich durch die mögliche Vielfalt der Strukturen und Wechselwirkungen der aminosäurebasierten Moleküle aus. Durch den variablen Aufbau der Primärsequenz aus den 20 proteinogenen Aminosäuren zeichnen sich Biomoleküle jedoch durch eine hohe Selektivität aus. Dadurch werden selektive Adhäsionen auf unterschiedlichsten Oberflächen nutzbar.<sup>[107]</sup> Der Einzug in die Materialwissenschaften resultiert aus der immer besseren Zugänglichkeit der Peptide und Proteine. Daher fungieren heutzutage Proteine u. a. als Additive in handelsüblichen Waschmitteln oder als Stabilisatoren bei der Synthese von Nanopartikeln. Durch Adsorption auf den Partikeloberflächen können die Biomoleküle Partikelaggregation unterdrücken, induzieren oder die Kristallisation der Partikel dirigieren.<sup>[108]</sup> Außerdem können peptidbeschichtete Oberflächen Zellwachstum verstärken sowie verringern, wodurch sie im Feld der Biomaterialien von Interesse sind.<sup>[109]</sup>

#### **2.2.4.2 Selektion peptidischer Binder**

Peptide schaffen den Übergang von der Biologie zur Materialchemie. Die flexiblen Peptidzusammensetzungen ermöglichen anpassungsfähige und hochspezifische Bindungsdomänen, die auf unterschiedlichsten Substraten adhärieren können. Dadurch lassen sich verschiedene Ziele mit einstellbaren Bindungseigenschaften adressieren. Das Verständnis über den Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion von Peptiden und Proteinen ist nach dem heutigen Wissensstand allerdings noch nicht hinreichend, um zielgerichtet Peptidsequenzen mit gewünschten Funktionen zu generieren. Das Zusammenwirken aus verschiedenen, experimentell schwierig zugänglichen Wechselwirkungsarten und externen Einflussfaktoren erschwert das Verständnis und den gezielten Einsatz der Peptidsequenzen. Rationale Ansätze sind meist computergestützte Rechnungen oder basieren auf natürlichen Ausgangsstrukturen mit ähnlicher Funktion.<sup>[110]</sup> Die Berechnung der Faltung komplexer Proteinstrukturen ist bisher noch sehr aufwendig und die Vorhersage der resultierenden Eigenschaften kaum möglich.<sup>[111]</sup> Um das volle Potenzial zu nutzen, sind kombinatorische Ansätze nötig, bei denen Bibliotheken aus vielen verschiedenen Sequenzen für ein ausgewähltes Substrat durchsucht werden können. Dieser Screening-Prozess hat den Vorteil, dass auch lokale

Fehlstellen mit ausgelesen werden, wodurch auch individuelle Besonderheiten einer Zieloberfläche berücksichtigt werden. Des Weiteren können neue Sequenzen gefunden werden, die die gewollte Funktion erfüllen, aber nicht in der Natur vorkommen bzw. bisher unbekannt waren.



**Abbildung 11:** (A) Schematischer Aufbau eines filamentösen M13-Phagen aus dem Phagen-Display. (B) Schematischer Prozess zur Herstellung von MgF<sub>2</sub>-affinen, oberflächenbindenden Peptid-Polymer-Konjugaten: (I) Erstes *Biopanning* der Phagen-Bibliothek mit MgF<sub>2</sub>-Partikeln, (II) Waschschriff zur Entfernung schwacher Binder, (III) Elution der stärkeren Binder, (IV) Amplifikation und erneutes *Biopanning*, (V) Amplifikation und Sequenzierung der Plasmid-DNA zur Identifikation affiner Peptidsequenzen, (VI) Chemische Synthese von affinen Peptid-Polymer-Konjugaten.

Die am meisten genutzten biokombinatorischen Techniken sind das Zelloberflächen- und das Phagen-Display.<sup>[112]</sup> Dabei werden entweder Zellen oder (Bakterio-)Phagen genetisch so modifiziert, dass sie randomisierte Hüllproteine an ihren Außenhüllen präsentieren, die mit den Zielflächen wechselwirken können (Abbildung 11 A).<sup>[113]</sup> Beim Phagen-Display sind es meist die pIII-Hüllproteine,<sup>[114]</sup> die sich an einem Ende der filamentösen M13-Phagen befinden und eine effektive Diversität von etwa 10<sup>9</sup> verschiedenen 12mer-Peptiden für das Oberflächen-Screening zur Verfügung stellen (Abbildung 11 B).<sup>[115]</sup> In einem typischen Experiment, wie es für diese Arbeit durchgeführt wurde, wird eine Partikelsuspension mit einer randomisierten Bibliothek aus Phagen inkubiert (sog. Biopanning, I). Phagen mit geringer Affinität für die Partikel werden in einem Waschschriff entfernt (II). Die stärker gebundenen Phagen höherer Affinität werden in einem neuen Gefäß von den Teilchenoberflächen eluiert und in Lösung vom festen Substrat getrennt (III). Die abgelösten Phagen werden mit Hilfe von speziellen *E. coli* Bakterien amplifiziert, wobei eine neue Bibliothek mit bereits erhöhter Affinität für die zu adressierende Oberfläche entsteht. Diese wird mit einer frischen Partikelsuspension inkubiert und der Phagen-Display-Zyklus beginnt erneut (IV). Je nach angestrebter Affinität wird der Zyklus zwei bis sechs Mal wiederholt, wobei das

Phagen-Ensemble kleiner, aber substratspezifischer werden sollte. Nach der finalen Amplifikation kann die Plasmid-Desoxyribonukleinsäure (engl. *deoxyribonucleic acid*, DNA) einzelner Phagen isoliert und sequenziert werden (V). Aus den erhaltenen DNA-Sequenzen werden die Peptid-Primärstrukturen ermittelt. Die gefunden Sequenzen können chemisch synthetisiert werden, um ihre tatsächlichen Bindungseigenschaften zu testen. Nach dieser Evaluierung werden auf verschiedenen Wegen Peptid-Polymer-Konjugate hergestellt, die durch ihre Bifunktionalität verschiedene Aufgaben übernehmen können (Kapitel 3.1 & Kapitel 3.2).

Biokombinatorische Ansätze bieten viele Vorteile gegenüber empirischen oder rationalen Methoden zur Oberflächenmodifikation von Partikeln, wie sie u. a. bei Sol-Gel-Synthesen eingesetzt werden.<sup>[116]</sup> (i) Zum einen wird die potenzielle Vielfalt der Wechselwirkungen von oberflächenaffinen Peptiden durch synthetische Polymere oder Polyaminosäuren ohne Sequenzspezifität nicht erreichbar. Eine bessere Kontrolle über die Primärstruktur von synthetischen Polymeren steht zwar mit den sog. Präzisionspolymeren (engl. *precision polymers*)<sup>[117]</sup> im Fokus aktueller Forschungen. Die bisherigen Fortschritte reichen allerdings noch nicht an die Sequenzkontrolle der natürlichen Polymere heran. Einen Schritt zur Nachahmung bilden neben diesen Präzisionspolymeren kombinatorische Ansätze zur Suche von Nanopartikel-stabilisatoren.<sup>[118]</sup> Dabei kann die Stärke der Wechselwirkungen variieren, was die resultierende Funktion entscheidend beeinflusst. Im Fall von Calciumphosphaten können starke und schwache Binder zwar beide eine Kristallisation induzieren. Die schwächeren Binder lassen allerdings kleinere Kolloide entstehen.<sup>[119]</sup> (ii) Der zweite und entscheidendere Vorteil ist die Selektivität. Diese kann aktuell nicht und wird auch noch in den nächsten Jahren nicht ausreichend erklärbar sein, als dass rationale Binder vergleichbar funktionale Ergebnisse liefern könnten. Für einzelne funktionelle (Seitenketten-)Gruppen sind zwar einige Affinitäten bekannt. Beispielsweise binden Thiole (z. B. in Cys)<sup>[120]</sup> und Imidazole (z. B. in His)<sup>[121]</sup> besonders stark auf Goldoberflächen und Dopamine (z. B. in modifiziertem Tyr) auf Eisenoxidflächen. Allerdings vermitteln diese Gruppen auch Haftungen auf anderen Materialien. Besonders Dopamin ist auch ein hervorragender Binder für diverse Metalloxide.<sup>[122]</sup> Die tatsächlichen Bindungseigenschaften gemischter Wechselwirkungen sind bislang jedoch unkalkulierbar. Das zeigt sich an Beispielen, bei denen bereits kurze Peptide im Gegensatz zu homologen Polyaminosäuren zwischen unterschiedlichen Kristallebenen desselben Halbleiters oder zwischen Polymethacrylaten verschiedener Taktizitäten

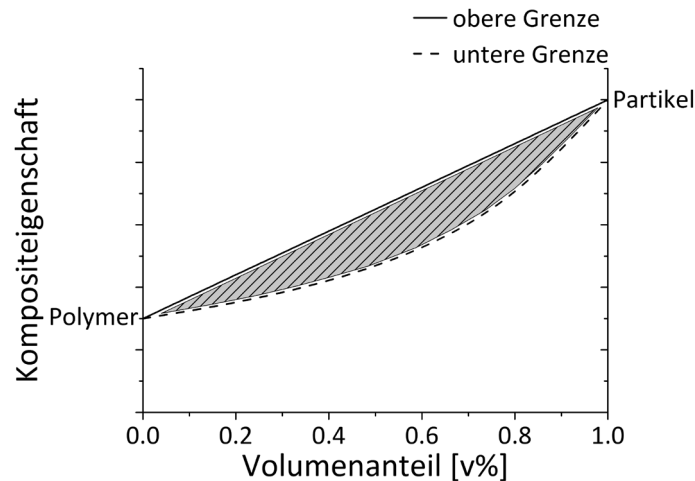


diskriminieren.<sup>[123]</sup> Andere unterscheiden zwischen amorphen Calciumphosphat-Spezies und Hydroxylapatit.<sup>[124]</sup> (iii) Der dritte Vorteil ist, dass beim biokombinatorischen Screening nicht nur eine ideale Oberfläche angenommen wird, sondern dass das tatsächliche Zielsubstrat ausgelesen wird. Auch hierfür sind die Flexibilität der Sekundärstrukturen und die der Einzelbausteine entscheidend. Jeder Abschnitt des festen Materials bis zu wenigen nm<sup>2</sup> kann die Selektion beeinflussen. Dazu zählen chemische Verunreinigungen, unterschiedliche Kristallgitterebenen, Defektstellen, Partikelkrümmungen und andere Inhomogenitäten. Zwar wird für die Arbeit mit den genmodifizierten Organismen während des Screening-Prozesses ein Labor mit einer biologischen Schutzstufe benötigt. Die zuvor genannten Gründe sprechen dennoch für den Einsatz von biokombinatorischen Methoden wie dem Phagen-Display zur Identifikation von materialspezifisch bindenden Peptiden. Mit peptidischen Bindern mit spezifischen Affinitäten für ausgewählte Materialien sollten sich Oberflächen derart modifizieren lassen, dass die Verträglichkeit von Stoffen unterschiedlicher Zusammensetzungen und Beschaffenheiten verbessert wird. Auf diesem Weg könnten durch die Optimierung der Grenzflächen Hybridmaterialien mit verbesserten Eigenschaften entwickelt werden.

#### **2.2.4.3 Grenzflächenstabilisierung in Kompositen**

In Biomaterialien sorgen viele verschiedene Bestandteile im komplexen Zusammenspiel für die spezialisierte, biologische Funktion. In einfachen Zweikomponentensystemen hingegen sind die Eigenschaften beeinflusst durch die Auswahl des Matrixpolymers sowie durch die Eigenschaften und die Verteilung der Füllstoffe. An dieser Stelle spielt die Größe der Partikel eine entscheidende Rolle. Durch den Größeneffekt können kleinere Partikel bei gleicher Füllmasse durch eine größere Oberfläche und eine höhere Dispersität einen stärkeren Effekt erzielen als größere Partikel. Auch die Art der Prozessierung und die Struktur des Komposits, welche stark vom Vernetzungsgrad, der Kontaktfläche und der Porosität des finalen 3D-Gerüst abhängig ist, tragen dazu bei. Im Idealfall lassen sich einige Werkstoffeigenschaften aus den Eigenschaften und den Volumenanteilen der Einzelkomponenten abschätzen. Nach einer mathematisch begründeten Mischungsregel lassen sich die Materialeigenschaften eines Komposits (z. B. E-Modul oder Härte) aus einem Matrixpolymer und Füllpartikeln

näherungsweise theoretisch berechnen (Abbildung 12). Die Eigenschaften der resultierenden Komposite liegen demnach zwischen den Materialeigenschaften der Einzelkomponenten und sind je nach Belastungsrichtung begrenzt durch ein oberes und ein unteres Limit.<sup>[125]</sup>

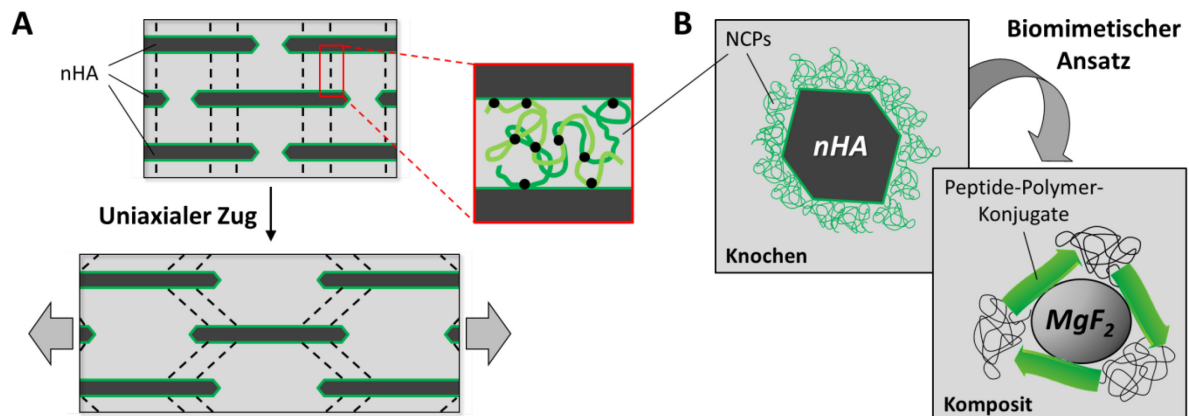


**Abbildung 12:** Abhängigkeit einer allgemeinen Materialeigenschaft eines Komposits (z. B. E-Modul) von den Eigenschaften der Einzelkomponenten und des Volumenanteils des Füllmaterials abgeschätzt nach der Mischungsregel. Nach dieser theoretischen Betrachtungsweise liegt die Eigenschaft des resultierenden Komposits zwischen einer unteren und einer oberen Grenze im grau schraffierten Bereich.

Diese Betrachtungsweise vernachlässigt jedoch den Einfluss der Partikelgrößen, -verteilungen und der Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und der Matrix. Letzterer wurde bei der Entwicklung von Kompositen lange außer Acht gelassen bzw. war messtechnisch nicht zugänglich. Das Verständnis über den molekularen Aufbau von natürlichen Materialien wie Holz, Perlmutter oder Knochen führte dazu, dass den Grenzflächen innerhalb der Materialien mehr Beachtung entgegen gebracht wurde.<sup>[126]</sup> Bioinspirierte Beispiele, deren Ansatz die Imitation der Plättchenform von natürlichem nHA ist, verwenden *Nanoclays* (dt. „Nanolehm“) wie Montmorillonit als Füllstoff, der sich zu Schichtstrukturen anordnet, um verstärkte Nanokomposite zu erschaffen.<sup>[127]</sup>

Die Bedeutung der Wechselwirkungen auf molekularer Ebene zeigt sich bei natürlichen Knochen. Knochen tragen schwere Lasten ohne zu brechen, sind sehr widerstandsfähig gegen Schläge und kompensieren lokale Schwachstellen wie kleine Risse oder Löcher.<sup>[128]</sup> Diese Tatsache ist bereits länger bekannt, aber erst zu Beginn dieses Jahrtausends wurde ein neuer Fokus auf die Grenzflächen auf nanoskopischer Ebene gelegt. Nach AFM-Messungen auf polierten Knochenoberflächen ließen zackenartige Kraft-Abstand-Kurven Thompson et al. vermuten, dass es Spezies gibt, die mehrere Bindungsstellen besitzen und sich bei Verformung ausdehnen können.<sup>[129]</sup>

Vorher wurde das „zackenartige“ mechanische Verhalten in Zugversuchen auf die Entstehung von Mikrorissen zurückgeführt. Vor einigen Jahren wurde die Ursache jedoch im molekularen Aufbau der Knochen gefunden.<sup>[130]</sup> An der Grenzfläche zwischen anorganischen nHA-Kristalliten und den Kollagenfibrillen im Knochen befinden sich eine Reihe von nicht-kollagenen Proteinen (NCPs), die das makroskopische Knochenverhalten entscheidend beeinflussen (Abbildung 13 A).<sup>[131]</sup>



**Abbildung 13: Bioinspirierte Grenzflächenstabilisierung in Kompositmaterialien:** (A) Schematische Darstellung eines Knochens mit nHA-Nanoplättchen (dunkelgrau) in einer weichen, organischen Matrix (hellgrau) vor und nach uniaxialen Zug, wobei die Verbindungen zwischen den Partikeln gedehnt werden (gestrichelte Linien); Vergrößerung: Bereich zwischen zwei Partikeln, die durch nicht-kollagene Proteine (NCPs) als polymere „Kleber“ mit vielen Einzelbindungsstellen (schwarze Punkte) verbunden sind (nach <sup>[132]</sup>). (B) Biomimetische Grenzflächen-nachahmung von NCPs in Knochen durch oberflächenaffine Peptid-Polymer-Konjugate in Kompositen.

Die NCPs adhären durch ihre hohe Affinität zu calciumhaltigen Oberflächen auf nHA, modifizieren damit die anorganischen Flächen und schaffen stärkere Wechselwirkungen zwischen anorganischer und organischer Phase. Bei Verformung lassen sich zuerst diese Verbindungsglieder strecken, wobei reversible, intermolekulare Bindungen gebrochen werden, bevor die Bindung zwischen den Knochenbestandteilen reißt (Abbildung 13 B, Vergrößerung). Dieses Verhalten der dehnbaren, reversiblen Verbindungen führte zum Begriff der „versteckten Längen“ an den Grenzflächen, die eine bessere Verteilung von Verformungsenergie und damit eine höhere Zähigkeit des Komposits ermöglichen.<sup>[132]</sup> Die NCPs, bei denen es im Knochen vordergründig um das calciumabhängige Zusammenspiel von Osteocalcin und Osteopontin geht, werden auf Grund dieser Eigenschaft auch als „Kleber“ bezeichnet.<sup>[133]</sup> Diese reversiblen Verbindungen können sich nach der Verformung wieder zurückbilden, wodurch ein dauerhaftes Materialversagen der Knochen vermieden wird.

Es gibt bereits einige Ansätze, die Eigenschaften in synthetischen Materialien durch Oberflächenmodifikationen zu verbessern. Materialverbesserungen wurden entweder durch nicht-kovalente Bindungen oder durch Pfropf-Strategien an Partikeloberflächen erzielt.<sup>[105c]</sup> In einigen Referenzen wurden Kohlenstoff-Nanostrukturen entweder chemisch funktionalisiert oder mit PCL bzw. Polydopamin beschichtet.<sup>[134]</sup> Auch kovalente Beschichtungen auf Partikeln wurden bereits in ähnlichen Studien eingesetzt wie anhand von Bioglas/PCL-, HA/Dopamin- oder HA/Polydopamin-Hybriden gezeigt wurde.<sup>[96b, 122c, 135]</sup> Alle diese Ansätze modifizieren zwar die Oberflächen von Füllstoffen für eine bessere Verbindung der Einzelkomponenten. Allerdings ist kein Ansatz dabei, der die materialspezifischen Eigenschaften der NCPs berücksichtigt. Andere Konzepte nutzen genetisch modifizierte, proteinbasierte Kompatibilisatoren zur Grenzflächenoptimierung.<sup>[136]</sup> Diese basieren jedoch lediglich auf Erfahrungswerten und empirischen Untersuchungen, was die Möglichkeiten zur Einstellbarkeit der Grenzflächen und zur Weiterentwicklung der Kompatibilisatoren stark einschränkt.

Der „Kleber“ in Knochen ist aus Polymeren aufgebaut, die auf der einen Seite an die mineralisierte Phase binden und auf der anderen Seite über ein weiches, deformierbares Gel verfügen.<sup>[126]</sup> Dieses Konzept der affinen Oberflächenadhäsion und der „versteckten Längen“ der NCPs an den Grenzflächen bildet die Grundlage der bioinspirierten Kompatibilisatoren, die in dieser Arbeit vorgestellt werden (Abbildung 13 B). Da spezialisierte Proteine wie NCPs strukturell sehr komplex und aufwendig herzustellen sind, werden Peptid-Polymer-Konjugate als einfache, chemisch herstellbare Modellkomponenten eingesetzt, um die Funktion der natürlichen Proteine in synthetischen Kompositen zu übernehmen. Neben der proteinverwandten Materialspezifität ermöglicht das kombinatorische Phagen-Display zur Auswahl der Peptid-Bindungsdomänen, dass neuartige Kompatibilisatoren identifiziert werden können. Dadurch lassen sich durch den Einsatz von Peptid-Polymer-Konjugaten mit variablen Materialaffinitäten Grenzflächen modulieren, die sich in maßgeschneiderten Materialeigenschaften der Komposite widerspiegeln. Deswegen ist ein Ziel dieser Arbeit die Untersuchung der Eigenschaften von Kompositmaterialien. Dies soll durch die Stabilisierung der internen Grenzflächen mit Hilfe von materialaffinen Peptid-Polymer-Konjugaten erreicht werden.

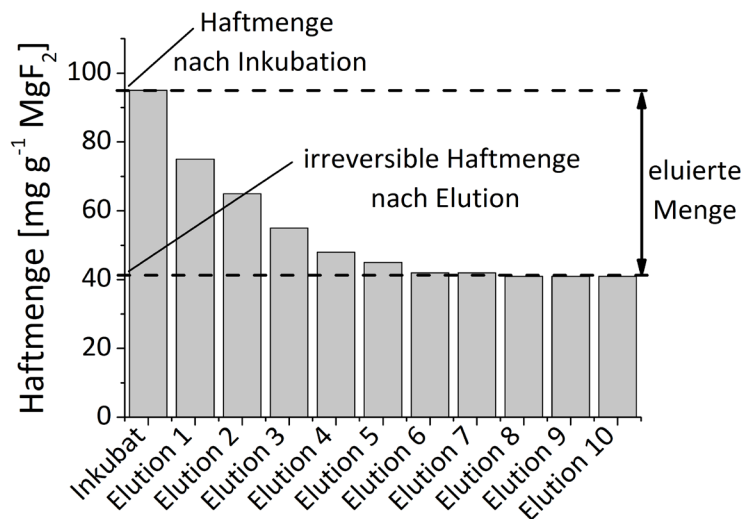
#### 2.2.4.4 Untersuchungsmethoden für Grenzflächeneigenschaften

Die Tatsache, dass viele Oberflächenprozesse noch nicht erschöpfend untersucht und verstanden sind, liegt auch an den Limitierungen der experimentellen Methoden. Viele analytische Prinzipien untersuchen hauptsächlich die Vorgänge, die komplett in Lösung oder in der Gasphase ablaufen. Aufbauten, die sich den Grenzflächenprozessen widmen, basieren meist auf denselben Grundlagen, wurden aber später entwickelt, weil fortgeschrittenere, technische Möglichkeiten nötig waren. Dadurch sind die grenzflächenerforschenden Techniken weniger weit entwickelt als die Bulk-basierten Methoden. Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Analysemethoden kurz beschrieben, wobei eine Aufteilung in qualitative und quantitative Techniken sowie Methoden speziell für die Untersuchung von Partikeln vorgenommen wurde.

Eine besondere Herausforderung ergibt sich, wenn nicht zusammenhängende Flächen, sondern die Oberflächen von Partikeln in Suspensionen betrachtet werden sollen. Diese weisen viele Inhomogenitäten und variable Größen auf oder sie sedimentieren. Außerdem scheiden zur direkten Quantifizierung sämtliche quantitativen, auf Streulicht basierenden Methoden aus, da die unkalkulierbare Streuung an den Partikeln die Ergebnisse verfälscht. Es gibt nur wenig leistungsstarke Methoden, die auch zur Untersuchung der Wechselwirkungen in Dispersionen genutzt werden können. Dazu zählen spezielle Techniken der Kernspinresonanz (engl. *nuclear magnetic resonance*, NMR)-Spektroskopie, die darauf abzielen, Bindungsvorgänge nachzuweisen oder für die Bindung wichtige Aminosäuren zu identifizieren.<sup>[137]</sup> Als markierungsfreie Messmethode ist die NMR-Spektroskopie mit der Möglichkeit zur Messung verschiedener Kerne sehr flexibel und leistungsstark, erfordert aber für jedes System eine erhebliche Anpassung und tiefgreifende Methodenkenntnisse.

Zur Untersuchung der Adsorption auf Partikeln, die zu komplex für Standard-Auswertungen, optimierungs- und damit zeitaufwendig oder durch Partikelgrößen limitiert sind, wurden fluoreszenzbasierte Adsorption-Elutionsexperimente entwickelt, die für nahezu alle sedimentierbaren Festkörper geeignet sind.<sup>[138]</sup> Diese Art von Waschexperimenten nutzt die Haftung von spektroskopisch detektierbaren Biomolekülen, die durch einen Fluoreszenzmarker im Überstand der anorganischen Partikel quantifizierbar sind. Gerade bei fluoreszenzspektroskopischen Messungen und anderen Methoden, die empfindlich gegenüber Streulicht sind, ist es nötig, alle Festkörper aus der Inkubationslösung zu entfernen (z. B. durch Zentrifugation). Durch

Inkubation der gewünschten Adhäsionsspezies in einer Partikelsuspension, anschließender Zentrifugation und wiederholten Waschschritten inklusive erneuter Zentrifugation lassen sich Elutionsprofile erstellen (Abbildung 14).



**Abbildung 14:** Exemplarisches Adsorption-Elutionsdiagramm eines fiktiven, fluoreszenzmarkierten Beispielpeptids: Gemessen werden die Fluoreszenzintensitäten des nicht adhären Peptids im Überstand der MgF<sub>2</sub>-Partikelsuspension. Aufgetragen sind die rückgerechneten Haftmengen (in mg oder µmol pro g MgF<sub>2</sub>) als Differenz aus den Messwerten und der Stammlösung des Peptids. Diese Waschexperimente sind eine praktische Screening-Methode, die Einblicke in Haftmengen und Schichtstabilitäten verschiedener Peptid/Konjugat-Spezies liefert.

Diese liefern indirekt absolute und relative Haftmengen nach der Inkubation bzw. nach verschiedenen Waschschritten. Das Elutionsverhalten über die wiederholten Waschzyklen gibt Auskunft über die Stabilität der Partikelbeschichtungen unter den gewählten Bedingungen und kann ohne großen Optimierungsaufwand als schnelle Auswahl (engl. *Screening*)-Methode für verschiedene Adhäsionsspezies eingesetzt werden. Zur Einordnung der Bindungseffizienz verschiedener Peptide ist die irreversible Haftmenge (nach wiederholten Waschzyklen) am stärksten von Bedeutung, da dieser Wert ein Maß für eine stabile Beschichtung unter den gewählten Bedingungen darstellt.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Grenzflächenstabilisierung von Nanopartikeln in Lösung

Das Wissen über die Bildung von Nanopartikeln ist entscheidend für die Kontrolle über deren Größe, Form und Oberflächenbeschaffenheit. Weitere zentrale Punkte sind die Stabilität in unterschiedlichen chemischen Umgebungen und die Langzeitstabilität, die die Lagerfähigkeit und die Handhabung der Nanopartikel beeinflussen. Üblicherweise werden Partikelstabilisatoren auf Basis empirischer bzw. literaturbasierter Ansätze ausgewählt. Diese Strategie behindert die Entwicklung neuartiger Stabilisatoren und die Optimierung bereits bekannter Vertreter. In den folgenden beiden Kapiteln 3.1.1 und 3.1.2 werden die Ergebnisse einer Methode zum biokombinatorischen Screening einer neuen Klasse von Stabilisatoren für Sol-Nanopartikel vorgestellt. In dieser Arbeit wird am Beispiel des nach dem Sol-Gel-Verfahren hergestellten  $\text{MgF}_2$  das Phagen-Display verwendet, um materialaffine Peptidsequenzen zu selektieren. Diese materialbindenden Peptide fungieren in der Form von Peptid-Polymer-Konjugaten als grenzflächenaktive Nanopartikel-Stabilisatoren. Qualitative und quantitative Bindungsstudien mit verschiedenen Peptiden und Peptid-PEG-Konjugaten erweitern das Verständnis der Peptidadhäsion auf  $\text{MgF}_2$ -Oberflächen. Die Variation des molekularen Aufbaus der Konjugate liefert dabei Einblicke in deren Struktur-Eigenschaftsbeziehungen, während die Untersuchung ausgewählter Inkubationsparameter Aussagen über entscheidende Faktoren der Adhäsion ermöglicht.

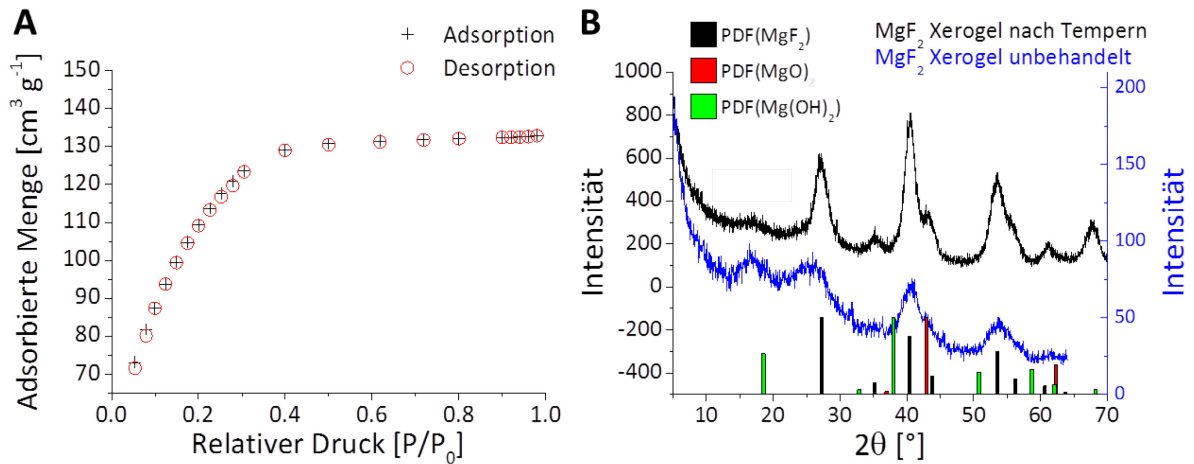
### 3.1.1 Adsorption von Peptid-Polymer-Konjugaten auf $\text{MgF}_2$ <sup>[139]</sup>

Zur Entwicklung von grenzflächenaktiven Stabilisatoren für Nanopartikel bedarf es eines grundlegenden Verständnisses der Grenzflächenprozesse und der Vorgänge auf den Partikeloberflächen. Dazu zählt auch die Adsorption von materialaffinen Peptiden auf Substratoberflächen. Diese auf suspendierten Submikro- und Nanopartikeln zu untersuchen stellt eine analytische Herausforderung dar, da viele der entsprechenden Analysemethoden auf ebene, wohl definierte Substratflächen angewiesen sind. Die Adsorption-Elutionsmessungen zur indirekten Bestimmung von absoluten und relativen Peptid- und Konjugat-Haftmengen auf den Partikeln sind deswegen eine wichtige Methode zur Untersuchung der Adsorptionseigenschaften. Vor der Untersuchung der Bindungseigenschaften wurden sowohl die chemischen und strukturellen Eigenschaften des Substrats als auch die der Peptid-Spezies eingehend charakterisiert. Daraufhin folgten systematische Studien über die Einflüsse der Peptid-Sequenzen, der Struktur der Peptid-Polymer-Konjugate und der Inkubationsbedingungen auf das Bindungsverhalten. Nach der Selektion eines geeigneten Peptid-basierten Binders wurden Peptid-PEG-Konjugate hergestellt, welche sowohl im Aufbau der Peptid-Domäne als auch in der Länge des Polymer-Blocks variiert wurden. Die Variation der Konjugatkonzentration und des pH-Werts während der Inkubation sowie die Messung der Substrataffinität lieferten weitere Einblicke. Aus diesen Experimenten konnten wichtige Faktoren für die Adhäsion abgeleitet werden, welche für das Design eines vielversprechenden Kandidaten für die Partikelstabilisierung in Kapitel 3.1.2 eingesetzt wurde.

#### 3.1.1.1 Charakterisierung des $\text{MgF}_2$

$\text{MgF}_2$  wurde ohne Zusatz von Stabilisatoren als optisch klares Sol hergestellt. Auf Grund des Potenzials zur kontinuierlichen Freisetzung von Magnesium- und Fluorid-Ionen ist es interessant für biologische Anwendungen. Die Entstehung von Nanopartikeln in der Synthese wurde durch breite  $^{19}\text{F}$ -NMR-Signale bei -198 ppm und über dynamische Lichtstreuung (DLS) nachgewiesen.<sup>[140]</sup> Stickstoff-Adsorption/-Desorption am unbehandelten Xerogel zeigte eine Isotherme des Typs I, die charakteristisch für die Existenz von Mikroporen ist.<sup>[141]</sup> Daraus wurde eine beträchtliche Brunauer-Emmet-Teller (BET)-Oberfläche von  $(390 \pm 10) \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  berechnet (Abbildung 15 A).<sup>[140-141]</sup>





**Abbildung 15: Charakterisierung des synthetisierten, unbehandelten MgF<sub>2</sub>:** (A) BET-Isotherme nach Stickstoff-Adsorption/Desorption (Vorbereitung für BET-Messung: Trocknung unter vermindertem Druck bei 80 °C). (B) Pulver-Röntgendiffraktogramme von unbehandeltem MgF<sub>2</sub>-Xerogel (blau) und Referenzmaterial nach Temperung (schwarz). Nanokristallines MgF<sub>2</sub>-Xerogel besteht im Rahmen der Bestimmungsgrenzen nach Vergleich mit Datenbankeinträgen nur aus MgF<sub>2</sub> in Rutil-Struktur (MgF<sub>2</sub>, PDF 41-1443, schwarze Balken; MgO, PDF 45-0946, rote Balken; Mg(OH)<sub>2</sub>, PDF 44-1482, grüne Balken).

Das unter vermindertem Druck getrocknete Xerogel wies in der Pulver-Röntgenbeugung (*powder X-ray diffraction*, PXRD) die charakteristischen Reflexe der Rutil-Struktur auf. Verunreinigungen wie MgO, Mg(OH)<sub>2</sub> oder andere Phasen konnten hierbei nicht nachgewiesen werden (Abbildung 15 B).<sup>[142]</sup> Dies bestätigt, dass hinreichend wasserfrei gearbeitet wurde. Diese MgF<sub>2</sub>-Sole bleiben allerdings nur im Synthesemedium Methanol bei Abwesenheit von Wasser stabil. Methanolische MgF<sub>2</sub>-Sole gelieren ab einer kritischen Wasserkonzentration irreversibel. Das Phagen-Display, mit dem das MgF<sub>2</sub> gescreent wird, ist hingegen auf eine gepufferte, wässrige Umgebung sowie stabile Partikel angewiesen, da nur unter diesen Bedingungen die Phagen funktional bleiben. Daher wurde das in Wasser stabile Xerogel für die Selektion der MgF<sub>2</sub>-affinen Binder eingesetzt, welches sich durch eine statistische Agglomeration der Sol-Primärpartikel auszeichnet. Die Entfernung des Methanols führt zu einer kinetisch kontrollierten Koagulation, bei der erwartet werden kann, dass eine energiegewichtete, statistische Mischung von Kristallflächen des Sol-Zustands repräsentiert wird. Damit stellt es ein sehr geeignetes Modellsystem für das Sol dar.<sup>[143]</sup> Die wenig intensiven XRD-Reflexe unterstützen diese Annahme, weil sie keine Vorzugskristallisation erkennen lassen (Abbildung 15 B). Mit Hilfe der Scherrer-Gleichung konnten Kristallitgrößen von etwa 20 nm abgeschätzt werden, während Rasterelektronenmikroskopie (engl. *scanning electron microscopy*, SEM)-Aufnahmen aus Primärpartikeln aufgebaute Agglomerate mit rauer Oberflächenbeschaffenheit zeigen (Abbildung 16).

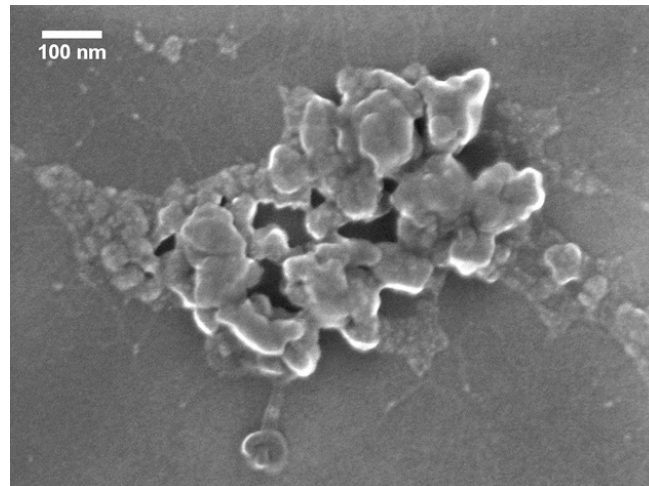
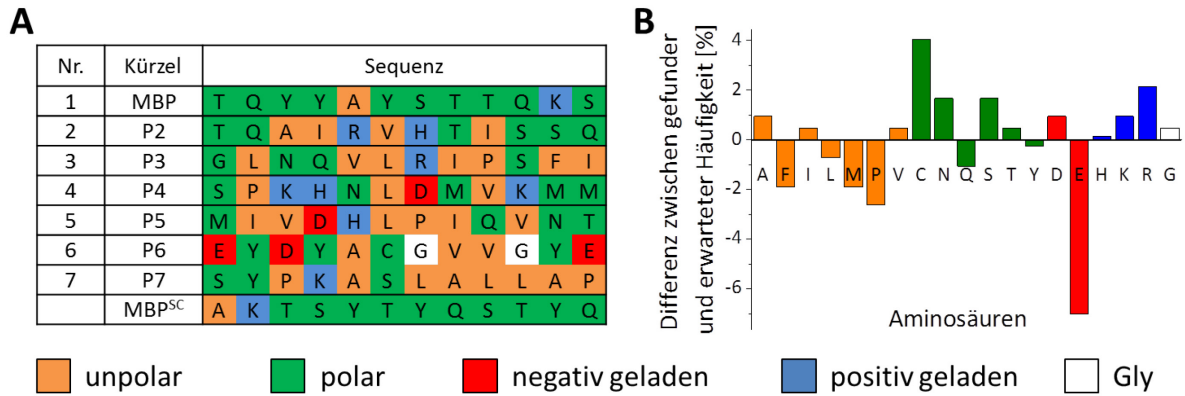


Abbildung 16: Repräsentative SEM-Aufnahme von MgF<sub>2</sub> ohne Zusatz von Stabilisatoren verdeutlicht den Aufbau des Xerogels aus statistisch agglomerierten Sol-Primärpartikeln.

### 3.1.1.2 Selektion materialaffiner Peptid-basierter Binder

Zur Identifikation von Adhäsionsdomänen, die später in das Design materialaffiner MgF<sub>2</sub>-Nanopartikel-Stabilisatoren einfließen sollen, wird das Phagen-Display verwendet. Dessen Protokoll wurde zuvor für die Selektion von peptidischen Bindern für anorganische Oberflächen modifiziert,<sup>[124]</sup> wodurch ein möglicher Sequenzraum von etwa 10<sup>9</sup> verschiedenen 12mer Peptid-Sequenzen zur Auswahl steht.

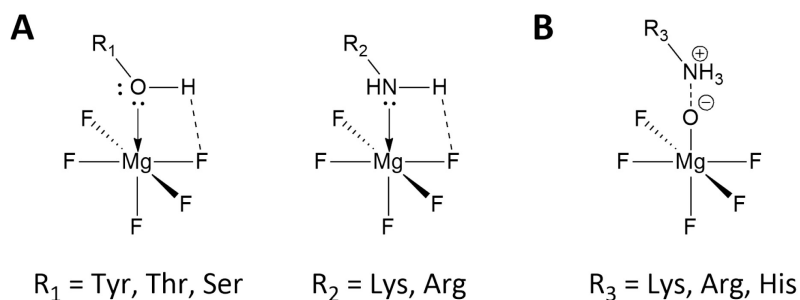
Durch die Abtrennung von wenig MgF<sub>2</sub>-affinen Phagen in jedem Zyklus reichern sich Phagen mit selektiven Adhäsionsmotiven für MgF<sub>2</sub> an (*Biopanning*). Es wurden drei *Biopanning*-Zyklen mit M13-Bakteriophagen durchgeführt. Nach der finalen Amplifikation der Bakteriophagen mit Hilfe von *E. coli* Bakterien wurden neun Phagen-Populationen ausgewählt, deren Plasmid-DNA sequenziert wurde, um die Peptid-Domänen mit potenziell hoher MgF<sub>2</sub>-Affinität zu erhalten.<sup>[140]</sup> Die resultierenden Peptidsequenzen sind in Abbildung 17 gezeigt. Der Vergleich der prozentualen Häufigkeit der nach Sequenzierung gefundenen Aminosäuren im Gegensatz zu der erwarteten Häufigkeit einer ursprünglichen, noch nicht verwendeten Phagen-Bibliothek zeigt eine veränderte Zusammensetzung. Die limitierte Zahl der Sequenzen erlaubt zwar keine statistisch signifikanten Rückschlüsse, die modifizierte Aminosäurenhäufigkeiten lassen jedoch einige Trends erkennen. Demnach dominieren nicht die hydrophoben bzw. entropischen Effekte die Peptid-MgF<sub>2</sub>-Wechselwirkungen, da die unpolaren Seitenkettenreste eher reduziert wurden (Abbildung 17 B). Die Häufigkeit der polaren Aminosäuren stieg hingegen an.



**Abbildung 17:** Ergebnisse des Phagen-Displays nach drei *Biopanning*-Runden mit  $\text{MgF}_2$ -Xerogel: (A) Peptidsequenzen 1-7 mit farbkodierten Aminosäuren (2 von 9 waren ohne Insert) und die randomisierte Sequenz (*scrambled MBP*, MBP<sup>SC</sup>) als Referenz zum  $\text{MgF}_2$ -bindenden Peptid (MBP). (B) Änderung der gefundenen Aminosäuren im Vergleich zu den theoretisch erwarteten Aminosäuren einer unveränderten Phagen-Bibliothek. Positive Balken stellen eine Anreicherung nach dem Phagen-Display dar.

In Kombination mit den Lewis-Säure/Base-Eigenschaften der  $\text{MgF}_2$ -Oberfläche lässt dies eine hervorgehobene Bedeutung von Wasserstoffbrücken-Bindungen (WSB) vermuten. Die hochgestörte Oberfläche mit teilweise ungesättigten Lewis-sauren Magnesium- und Lewis-basischen Fluorid-Zentren steht für die Ausbildung von WSB mit polaren Hydroxy-, Amino- oder Amid-terminierten Seitenketten zur Verfügung (Abbildung 18 A). Dafür spricht die Anreicherung von Ser, Thr, Asn, His, Lys und Arg. Auch das häufigere Vorkommen der Aminosäuren Gly und Ala, die die größte konformative Flexibilität ermöglichen, ist bei peptidischen Oberflächenbindern verständlich. Durch ein flexibles, dynamisches Rückgrat ist es wahrscheinlicher, dass eine stabile Konformation gefunden wird, die eine Bindung energetisch begünstigt und strukturell stabilisiert. Bekannt ist auch die Bedeutung von ionischen, bei milden pH-Werten geladenen Seitenketten. Erstaunlicherweise wurden eher die Aminosäuren mit kationischen Resten angereichert. Dieses Verhalten war mit Hinblick auf das positive  $\zeta$ -Potential der  $\text{MgF}_2$ -Partikel von +35 mV unerwartet. Häufige entgegengesetzt geladene, anionische Reste wären intuitiv zu vermuten gewesen, was anhand von anionischem Glu nicht bestätigt werden konnte. Dieses wurde im Vergleich zu der Ausgangsbibliothek sogar am stärksten reduziert. Die Peptide könnten z. B. mit Spuren von Sauerstoff-Spezies auf der  $\text{MgF}_2$ -Oberfläche wechselwirken, die in früheren Röntgenphotoelektronenspektroskopie (engl. *X-ray photoelectron spectroscopy*, XPS)-Studien nachgewiesen wurden (Abbildung 18 B).<sup>[144]</sup> Damit erscheint die Peptidadhäsion stärker abhängig von lokalen Gegebenheiten anstatt von globalen Eigenschaften wie der Oberflächenladung. Dieser Umstand verdeutlicht die Problematik

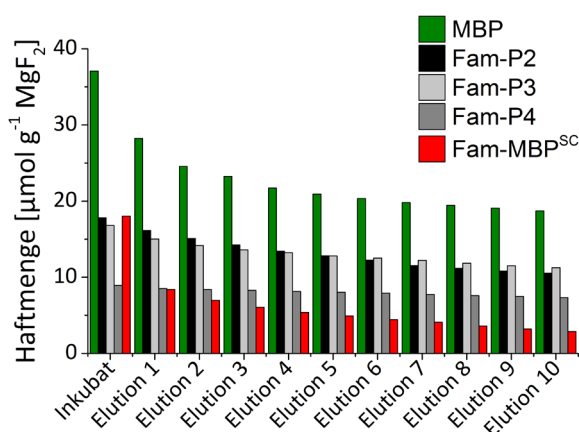
rationaler Ansätze nach heutigem Kenntnisstand und unterstreicht die Vorteile des Phagen-Displays, mit dem es möglich ist, die reale Oberfläche des Zielmaterials lokal auf ca. 1-10 nm<sup>2</sup> genau auszulesen.



**Abbildung 18:** Mögliche Wechselwirkungen von einzelnen Aminosäuren mit MgF<sub>2</sub>-Oberflächen: (A) Lewis-Säure- und Lewis-Base-Wechselwirkungen zwischen Alkohol- bzw. Amin-Gruppen mit ungesättigten Magnesium- und Fluorid-Zentren (nach <sup>[140]</sup>). (B) Coulomb-Wechselwirkungen zwischen kationischen Aminosäureresten mit punktuellen, sauerstoffhaltigen Verunreinigungen.

Die Sequenzen 1-4 wurden im Rahmen einer Diplomarbeit ausgewählt, mit Hilfe der festphasengebundenen Peptidsynthese (*solid-phase supported peptide synthesis*, SPPS) synthetisiert und auf ihre Bindungseigenschaften auf MgF<sub>2</sub>-Xerogel untersucht.<sup>[140]</sup> Die Ergebnisse der Adsorption-Elutionsexperimente dieser früheren Arbeit werden hier kurz zusammengefasst (Abbildung 19), um sie als Grundlage für die Diskussion neuer Analysen nutzen zu können. Das Peptid P1, im Folgenden als MgF<sub>2</sub>-bindendes Peptid (MBP, TQYYAYSTTQKS) bezeichnet, wies eine besonders hohe Zahl an polaren Seitenketten auf. Dabei besaßen sechs von zwölf Aminosäuren Hydroxy-Funktionen (Thr, Ser, Tyr). Das Peptid P2 (TQAIRVHTISSQ) wurde gewählt, weil es zum einen mit Hydroxy-terminierten Gruppen ebenfalls einen polaren Charakter besitzt und durch basische Aminosäuren (His, Arg) ergänzt wird. Zum anderen ist der Beginn der Sequenz der gleiche wie bei MBP und könnte ein entscheidendes Bindungsmotiv darstellen. Mit der Sequenz P3 (GLNQVLRIPSFI) ist zusätzlich ein relativ unpolarer Vertreter (Leu, Pro, Phe, Ile) ausgesucht worden. P4 (SPKHNLDMMVKMM) enthält mit die meisten geladenen Aminosäuren (Lys, His, Asp), die durch die Ausbildung von Coulomb-Wechselwirkungen zur Bindung auf anorganischen Oberflächen beitragen.<sup>[145]</sup> Während der Peptidsynthese wurden alle Sequenzen um einen Fluoreszenzmarker Carboxyfluorescein (*fluorescent amine marker*, Fam) und vier weitere Aminosäuren (GSGG) ergänzt, welche als Abstandhalter zwischen dem Marker und der Bindungsdomäne fungierten. Der Marker erleichtert die quantitative und qualitative Analyse der Oberflächenbindung. Die zusätzlichen Aminosäuren sorgen für eine konformative Flexibilität zwischen dem Fluoreszenzmarker und dem N-Terminus der Peptide und verringern den Einfluss des

Markers auf die Oberflächenhaftung. Bei der Diskussion der Bindungseigenschaften nach Adsorption-Elutionsexperimenten werden die Peptide bspw. als Fam-GSGG-TQYYAYSTTQKS-NH<sub>2</sub> bezeichnet (abgekürzt als Fam-MBP, für andere Peptide entsprechend). Die Zusammensetzung der Peptide wurde nach Abspaltung vom Harz mit Hilfe von Massenspektrometrie und <sup>1</sup>H-NMR-Spektroskopie nachgewiesen (Kapitel 6.3).



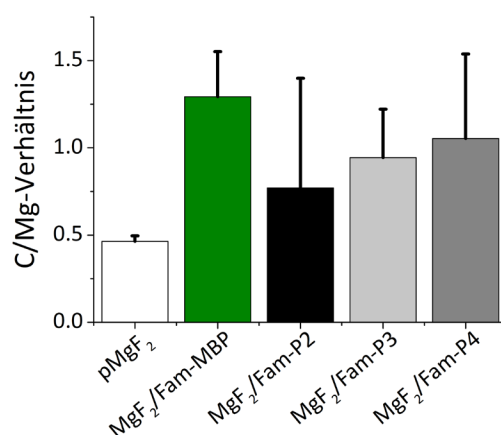
**Abbildung 19:** Adsorption-Elutionsdiagramm der Peptide, die durch das Phagen-Display selektiert wurden, auf MgF<sub>2</sub> in Wasser (Bedingungen: 0.5 mM Stammlösung, 10 mg MgF<sub>2</sub>-Xerogel, 4 h Inkubation bei RT, Waschschrte mit Wasser, nach <sup>[140]</sup>).

Um vor den Bindungsexperimenten besonders große Agglomerate des Xerogels auszusortieren, wurde das getrocknete Xerogel durch einminütige Sedimentation in Wasser fraktioniert und erneut getrocknet, bevor es mit den Peptid- und Konjugatlösungen inkubiert wurde. Daraufhin wurden 10 mg der anorganischen Partikel für 4 h bei Raumtemperatur (RT) in wässrigen Stammlösungen der Fam-Peptide inkubiert (0.5 mM, wenn nicht anders ausgezeichnet). Das Xerogel wurde durch Zentrifugation von der Lösung abgetrennt und der partikelfreie Überstand nach ausreichender Verdünnung fluoreszenzspektroskopisch vermessen. Durch die Bestimmung der Peptid-Restkonzentration in dieser Lösung kann ausgehend von der bekannten Ausgangskonzentration der Stammlösung auf die Peptid-Menge geschlossen werden, die an den Partikeln adsorbierte. Das Zentrifugat aus beschichteten Partikeln wurde in konsekutiven Elutionsschritten mit Wasser gewaschen und die Abtrenn- und Messschritte wiederholt. Die Methodik erlaubt Rückschlüsse über die absoluten Haftmengen der entsprechenden Peptide direkt nach der Inkubation und nach den Waschschrten. Letztere ist die Menge, die unter den gewählten Bedingungen irreversibel auf den Partikeln haften bleibt. Die Differenz der beiden Werte bildet die Abwaschmenge unter den gegebenen Bedingungen ab.

Die Adsorption-Elutionsversuche der Peptide auf den  $\text{MgF}_2$ -Xerogelpartikeln zeigten den starken Einfluss der Primärsequenzen auf das Bindungsverhalten und die Reversibilität der Haftung bei der Adsorption. Es sind starke Unterschiede sowohl in den anfänglichen als auch in den unter diesen Bedingungen irreversiblen Haftmengen nach den Waschungen erkennbar (Abbildung 19). Fam-MBP adhärirt mit  $37.1 \mu\text{mol}$  und  $18.7 \mu\text{mol}$  pro g  $\text{MgF}_2$  vor bzw. nach Waschschritten mit Abstand am meisten auf  $\text{MgF}_2$ . Fam-P2 und Fam-P3 verhalten sich bezogen auf die anfänglichen ( $17.8$  bzw.  $16.8 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) und die irreversiblen Haftmengen ( $10.5$  bzw.  $11.2 \mu\text{mol g}^{-1}$ ) sehr ähnlich. Das klar unterschiedliche Verhalten von Fam-MBP und Fam-P2 lässt schlussfolgern, dass das Motiv Thr-Gln, das beide Peptide *N*-terminal gemein haben, für die Bindung nicht essentiell ist. Wie bereits durch die allgemeine Analyse der Aminosäurehäufigkeiten vermutet, stellte sich das dreifach ionische Fam-P4 mit Haftmengen von  $8.9 \mu\text{mol g}^{-1}$  nach Inkubation und  $7.3 \mu\text{mol g}^{-1}$  nach Elutionen als ineffektive Bindungssequenz heraus. MBP zeigte damit die effektivste Beschichtung der  $\text{MgF}_2$ -Partikel, auch wenn das Abwaschprofil eine relativ große Masse reversibel gebundenen Peptids aufzeigte. Eine Differenz von  $18.3 \mu\text{mol g}^{-1}$  konnte im Fall von Fam-MBP wieder von der  $\text{MgF}_2$ -Oberfläche eluiert werden. Das entspricht dem größten Anteil ( $\Delta 49\%$ ) unter den Peptiden. Die Ausbildung von Peptid-Multischichten kann als Ursache dieser schwach gebundenen Peptide genannt werden. Dies ist bereits für verwandte Peptid-Partikelsysteme bekannt.<sup>[146]</sup> Durch die geringe Nettoladung von MBP (+1 bei neutralem pH) erscheinen intermolekulare Wechselwirkungen wahrscheinlich. Auch Erfahrungen aus dem Umgang mit MBP unterstützen diese Hypothese. Bei höheren Konzentrationen des Peptids in wässriger Lösung bildet sich ein Hydrogel, was auf eine starke Tendenz zu Peptid-Peptid-Wechselwirkungen zurückzuführen ist. Da die Multilagen allerdings abgewaschen werden konnten, waren die Bindungen zur Oberfläche stärker als die intermolekularen Anziehungskräfte innerhalb der Peptid-Mehrfachschichten. Nach diesen Erkenntnissen wurde die Sequenz MBP auf Grund der herausragenden Bindungseigenschaften für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

Der Vergleich der unterschiedlichen Peptid-Sequenzen zeigte, dass die Primärsequenz einen starken Einfluss auf die Bindungseigenschaften hat. Weiterführend sollte untersucht werden, welche Rolle die Reihenfolge der Aminosäuren spielt. Die veränderte Anordnung kann die Nachbarschaft einzelner Aminosäuren und die Faltung der gesamten Sequenz entscheidend beeinflussen, wodurch die effektiven Bindungsdomänen gestört werden. So ist bspw. bekannt, dass Peptide aus nur drei

Aminosäuren effektive Bindungsmotive darstellen können.<sup>[147]</sup> Außerdem kann die Position der Einzelbausteine die Sekundärstruktur und damit die räumliche Zugänglichkeit bestimmter Funktionalitäten entscheidend verändern. Um ein besseres Verständnis über die Haftungsparameter des MBP-MgF<sub>2</sub>-Systems zu entwickeln, wurde deswegen die Reihenfolge der Aminosäuren in MBP verändert. Diese randomisierte Referenzsequenz (*scrambled* MBP, MBP<sup>SC</sup>) besteht aus den gleichen Aminosäuren wie MBP, die allerdings zufällig neu zu MBP<sup>SC</sup> angeordnet wurden (AKTSYTYQSTYQ, Abbildung 17 A). Das ebenfalls fluoreszenzmarkierte Referenz-Peptid Fam-MBP<sup>SC</sup> verhielt sich deutlich anders als das Vorbild MBP. Die Haftmenge war sehr viel geringer und mit nur 2.9  $\mu\text{mol g}^{-1}$  MgF<sub>2</sub> nach den Elutionen wurden 94% des MBP<sup>SC</sup> wieder abgewaschen. Damit bestätigte sich, dass nicht nur die Summe der möglichen Wechselwirkungen, sondern auch deren Anordnung von zentraler Bedeutung für eine stabile Adhäsion sind.<sup>[148]</sup>



**Abbildung 20:** Kohlenstoff-zu-Magnesium-Verhältnisse aus EDX-Messungen der Oberflächen von peptidbeschichteten MgF<sub>2</sub>-Xerogelen und unbeschichtetem, purem MgF<sub>2</sub> (pMgF<sub>2</sub>) nach einem Waschschrift mit Wasser.

Mittels Fluoreszenzmikroskopie konnte der direkte Nachweis erbracht werden, dass die MgF<sub>2</sub>-Partikel erfolgreich mit den Fam-markierten Peptiden beschichtet werden konnten.<sup>[140]</sup> Ergänzend wurden energiedispersive Röntgen (engl. *energy dispersive X-ray spectroscopy*, EDX)-Spektroskopiemessungen an der Oberfläche der beschichteten Partikel durchgeführt. Dabei wurden erhöhte Kohlenstoff-zu-Magnesium-Verhältnisse C/Mg auf dem Xerogel festgestellt (Abbildung 20). Anstiege um Faktoren zwischen 1.7 und 2.8 wurden im Vergleich zu unbeschichtetem, purem MgF<sub>2</sub> (pMgF<sub>2</sub>) gefunden. Dies spiegelt die Belegung der Partikeloberflächen mit den Peptiden wider. Die Tatsache, dass selbst bei pMgF<sub>2</sub> niedrige C/Mg-Werte gemessen wurden, ist durch Einschlüsse von nicht umgesetzten Methoxy-Funktionen aus der methanolischen Syntheseroute zu begründen. Die Vergleiche verschiedener Peptid-Sequenzen und die Variation der

Reihenfolge der Aminosäuren unterstreichen die Komplexität der Bindungsereignisse und damit gleichzeitig die Wichtigkeit von kombinatorischen Methoden zur Auswahl potenzieller Oberflächenbinder.

### 3.1.1.2 Haftung von Peptid-PEG-Konjugaten

Im Hinblick auf Oberflächenmodifikationen zur Stabilisierung von Nanopartikeln sind reine Peptide wenig geeignet, weil sie je nach Sequenz und Adsorptionsmuster sogar die Agglomeration der Partikel initiieren können.<sup>[149]</sup> Aus diesen Überlegungen heraus wurde MBP um einen PEG-Anteil zum MBP-Polyethylenglycol-Konjugat (*MgF<sub>2</sub>-binding peptide-PEG<sub>73</sub> conjugate*, MBC) erweitert. Dies stellt einen maßgefertigten Stabilisator für MgF<sub>2</sub>-Nanopartikel dar. Die PEG-Konjugate ( $M_n = 3200 \text{ g mol}^{-1}$ , Dispersität  $\bar{D} = 1.04$ ) sind im Multigramm-Maßstab herstellbar. Außerdem weist PEG in Wasser und Alkoholen eine gute Löslichkeit und in Lösung wenig zwischenmolekulare Wechselwirkungen auf, was zu einem abschirmenden Effekt führt.<sup>[150]</sup> Des Weiteren ist es für seine biokompatiblen Eigenschaften bekannt.<sup>[151]</sup> Konzeptionell soll die monodisperse MBP-Sequenz vermittelt über sequenzspezifische Adhäsion den Kontakt zur MgF<sub>2</sub>-Oberfläche herstellen. Der PEG-Block soll die Löslichkeit des Peptids erhöhen und die Partikel-Oberflächen sterisch abschirmen, um so die irreversible Agglomeration der MgF<sub>2</sub>-Partikel zu verhindern.<sup>[151]</sup>

Analog zu den Untersuchungen der Peptide wurden auch mit dem Peptid-PEG-Konjugat Adsorption-Elutionsexperimente durchgeführt. Diese wiesen erheblich größere Bindungsmengen und ein Abwaschverhalten auf, welches sich von denen der reinen Peptide unterschied (Abbildung 21). Es wurden  $(26 \pm 2) \mu\text{mol MBC pro g MgF}_2$  nach Inkubation nachgewiesen, die im Gleichgewicht auf den Partikeln adhärten. Dies entspricht bei MBC  $(140 \pm 2) \text{ mg g}^{-1}$  Konjugat pro g MgF<sub>2</sub>. Während der intensiven Waschschrte wurden nur 7% eluiert. Damit ergab sich eine unter den gegebenen Bedingungen stabile Beschichtung von  $(24 \pm 2) \mu\text{mol g}^{-1}$ . Diese geringe Abwaschmenge ist konsistent mit den Beobachtungen von Schwemmer et al. und lässt sich auf den PEG-Block zurückführen.<sup>[146]</sup> Die Adsorption von der Peptid-PEG-Konjugate auf den Partikeloberflächen führte zu peptidvermittelten Bindungen auf dem MgF<sub>2</sub>. Die Polymerblöcke verhindern vermutlich die Anlagerung von weiteren Konjugaten und somit die Ausbildung von Multischichten. Daraus sollte eine sterische Stabilisierung der Nanopartikel in wässriger Lösung resultieren.<sup>[151]</sup>



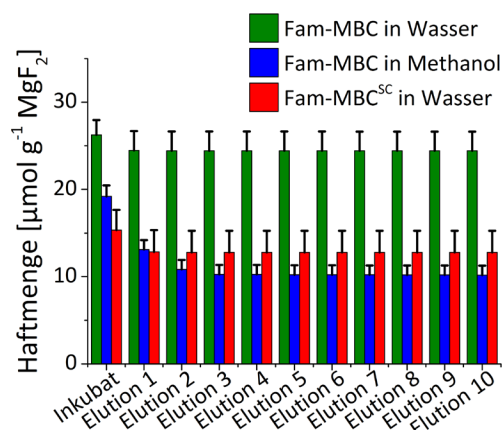
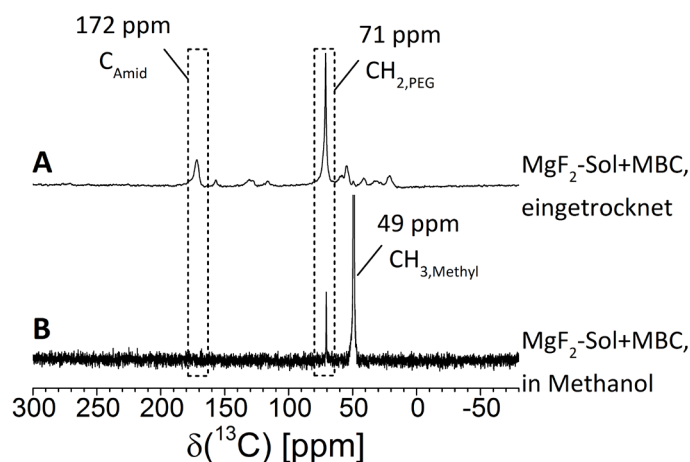


Abbildung 21: Adsorption-Elutionsdiagramm von  $\text{MgF}_2$ -bindendem Peptid-PEG-Konjugat ( *$\text{MgF}_2$ -binding peptide-PEG conjugate*, Fam-MBC) in Wasser bzw. Methanol (Bedingungen: 0.5 mM Stammlösung in Wasser/0.28 mM Stammlösung in Methanol wegen begrenzter Löslichkeit, 10 mg  $\text{MgF}_2$ -Xerogel, 4 h Inkubation bei RT, Waschschrte mit entsprechendem Inkubationslösungsmittel).

Da die Sol-Nanopartikel in Methanol synthetisiert wurden, musste sichergestellt werden, dass die Bindungseigenschaften in Methanol weiterhin vorhanden sind. Dazu wurden analoge Adsorption-Elutionsversuche mit Fam-MBC in Methanol durchgeführt. Diese zeigten ein ähnlich schnell abflachendes Beschichtungsverhalten im Vergleich zu den Messungen in Wasser trotz geringerer absoluter Werte von  $(10 \pm 1) \mu\text{mol g}^{-1}$  nach den Elutionsschritten (mit Methanol, Abbildung 21). Ein direkter Vergleich der absoluten Haftmengen kann aber zwischen beiden Fam-MBC-Messungen in Wasser und Methanol bedingt durch die geringe Löslichkeit von MBC in Methanol nicht gezogen werden. Dennoch kann durch die adsorbierte Menge von  $10 \mu\text{mol g}^{-1}$  in Methanol eine hinreichende Stabilisierung erwartet werden.

Auch der Vergleich von Fam-MBC mit einem Kontrollkonjugat Fam-MBC<sup>SC</sup> (*scrambled  $\text{MgF}_2$ -binding peptide-PEG<sub>73</sub> conjugate*, MBP<sup>SC</sup>-PEG<sub>73</sub>, MBC<sup>SC</sup>), das die Sequenz MBP<sup>SC</sup> beinhaltetete, lieferte Resultate, die die Wichtigkeit der Peptidsequenz unterstreicht (Abbildung 21). Konsistent mit den Beschichtungsverhalten der Peptide haftete mit nur  $(15 \pm 2) \mu\text{mol g}^{-1}$  auch MBC<sup>SC</sup> weniger nach der Inkubation als bei MBC ( $(24 \pm 2) \mu\text{mol g}^{-1}$ ). Auch die stabile Beschichtung ist mit  $(13 \pm 3) \mu\text{mol g}^{-1}$  bei MBC<sup>SC</sup> um den Faktor 2 geringer. Das Abwaschprofil entspricht dem der anderen Konjugate. Bei all diesen Konjugatmessungen verringerte sich innerhalb der ersten drei Waschungen die Haftmenge noch. Danach wurde ein Plateau erreicht, das der irreversiblen Beschichtung unter den gegebenen Bedingungen entspricht. Dieses Verhalten unterscheidet die Konjugate von den meisten Peptiden und weist darauf hin, dass eine Bildung von Multischichten unterdrückt wird.

Außerdem konnte mit Hilfe von  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS (engl. *magic angle spinning*) Festkörper-NMR-Experimenten die Immobilisierung des MBP-basierten Konjugats MBC ohne Fluoreszenzmarker auf den  $\text{MgF}_2$ -Sol-Partikeln in Lösung nachgewiesen werden. Dazu wurden die  $^{13}\text{C}$ -Kreuzpolarisationsspektren des MBC-stabilisierten  $\text{MgF}_2$  in getrockneter Form und dispergiert in Methanol verglichen. In der festen Probe konnten einige  $^{13}\text{C}$ -Signale dem MBC zugeordnet werden (Abbildung 22 A). Die beiden prominentesten stammten von Amid-Kohlenstoff-Atomen des Peptids bei 172 ppm und von PEG-Kohlenstoff-Atomen bei 71 ppm. Im Spektrum des dispergierten  $\text{MgF}_2$ /MBC konnten diese beiden Signale ebenfalls gefunden werden (Abbildung 22 B). Das liefert den Beweis dafür, dass das Konjugat auch in Lösung weiterhin auf den Partikeln immobilisiert vorliegt. Durch die höhere Verdünnung in der Suspension und ein stark dominierendes Signal bei 49 ppm, das von immobilisierten Methoxid-Spezies verursacht wurde, ist das Amid-Signal nur noch schwach erkennbar.<sup>[91, 152]</sup> Dennoch konnte mit Hilfe der CP MAS NMR neben der EDX-Spektroskopie (Abbildung 20) ein weiterer Nachweis für die Immobilisierung der Peptid-Bindungsdomänen auf den Partikeln erbracht werden.

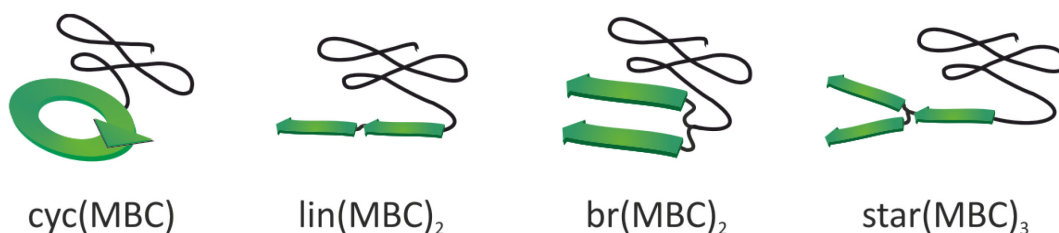


**Abbildung 22:**  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR-Spektren von (A) eingetrocknetem MBC-stabilisiertem  $\text{MgF}_2$ -Sol und (B) MBC-stabilisiertem  $\text{MgF}_2$ -Sol in Methanol. Da nur auf den Partikeln immobilisierte Spezies in CP-Experimenten sichtbar sind, zeigt die Anwesenheit der Peptid- (172 ppm,  $\text{C}(\text{Amid})$ , sehr schwach) und PEG-Kohlenstoffe (71 ppm,  $\text{CH}_2(\text{PEG})$ ) in Lösung, dass die Konjugate auf den  $\text{MgF}_2$ -Partikeln haften. Beim dominierenden Signal bei 49 ppm handelt es sich um eine Mg-Methoxid-Spezies.<sup>[91, 152]</sup> (Bedingungen: 8 mol% MBC, 4 mm Rotor, Rotationsgeschwindigkeit = 10 kHz, (A): Feststoff, (B) 1.5 mL Probe).

### 3.1.1.3 Sequenzabhängige Haftung

Die Klasse der Peptid-Polymer-Konjugate hat bewiesen, dass sie durch vielseitig kombinierbare Wechselwirkungen spezifische Bindungen zu Molekülen und

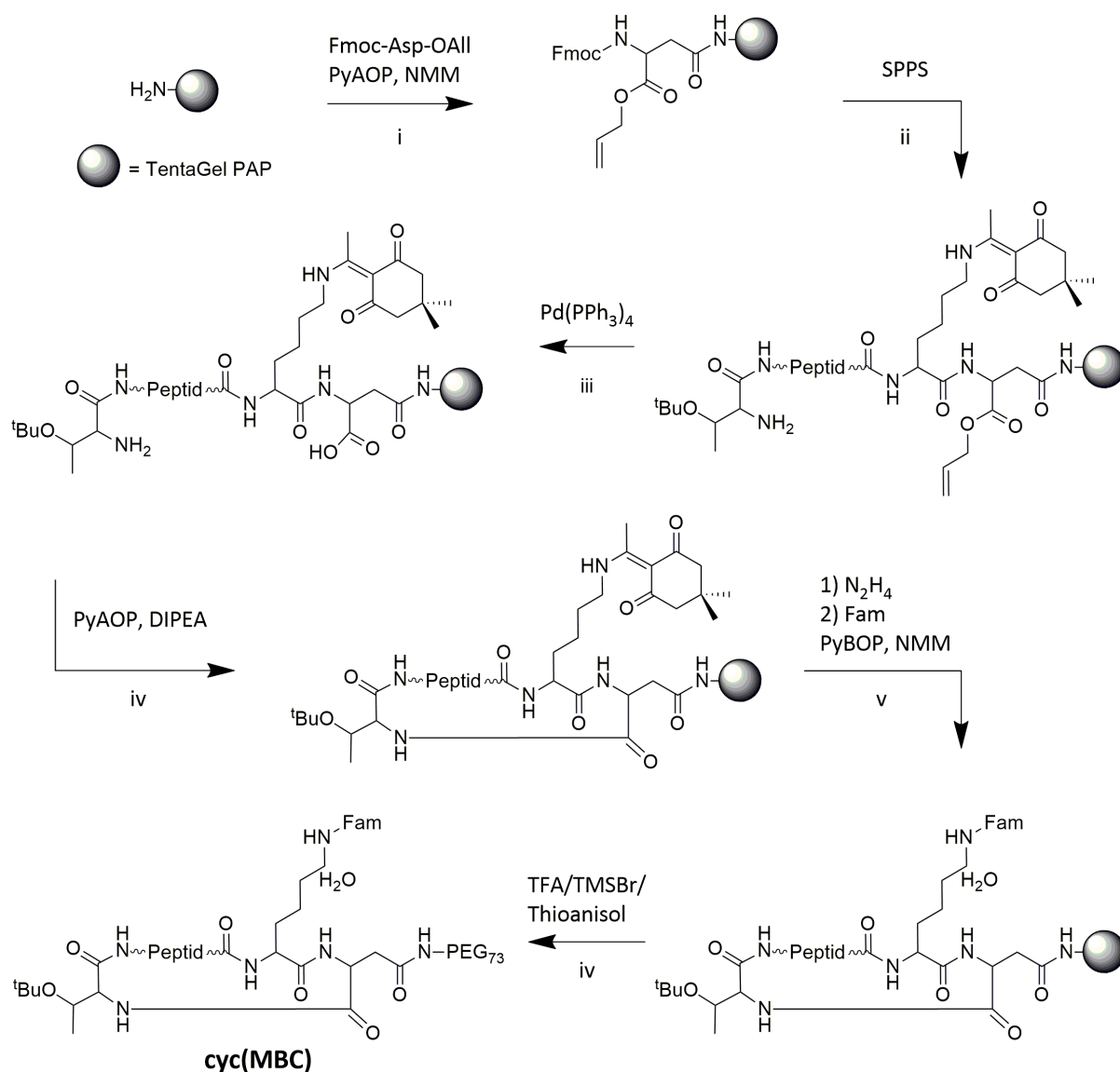
Oberflächen ausbilden kann.<sup>[4d, 150, 153]</sup> Diese sequenzspezifischen Wechselwirkungen sind in der Zusammensetzung der Peptide und damit der Struktur der Konjugate begründet. Deswegen wurden im Rahmen der Bachelorarbeit von Frank Bienwald als Teilprojekt dieser Dissertation Peptid-PEG-Konjugate verschiedener Architekturen synthetisiert, um Struktur-Eigenschaftsbeziehungen bei der Oberflächenadhäsion näher zu untersuchen.<sup>[154]</sup> Dazu wurden die monodispersen Peptid-Blöcke wie in Abbildung 23 zusammengefasst variiert.



**Abbildung 23:** Peptid-PEG-Konjugate zur Untersuchung der Struktur-Eigenschaftsbeziehungen bei der Adhäsion: Sequenzabhängigkeit mit zyklisierter Sequenz (*cyclic MBC*, cyc(MBC)), doppelter Sequenz in Reihe (*linear MBC*, lin(MBC)<sub>2</sub>), doppelter verzweigter Sequenz (*branched MBC*, br(MBC)<sub>2</sub>) und dreifacher sternförmiger Sequenz (*star-shaped MBC*, star(MBC)<sub>3</sub>).

Es wurde untersucht, inwiefern sich die Anordnung bzw. die Anzahl der MBP-Sequenz auf die Adhäsion auf MgF<sub>2</sub> auswirkt. Hierfür wurde zuerst ein Konjugat mit zyklisierter Bindungssequenz (engl. *cyclized MBC*, cyc(MBC)) dargestellt. Um die festphasengebundene Zyklisierung zu erreichen, wurden Asp und Lys als erste Bausteine zusätzlich in die Sequenz eingefügt. Asp sollte den Ringschluss ermöglichen, während Lys eine Anbindungsstelle für die Fluoreszenzmarkierung schafft. Um den Hauptteil der Peptide nach der Fmoc-Strategie aufbauen zu können, wurden für die zusätzlichen Aminosäuren orthogonale Schutzgruppen gewählt (Abbildung 24). Diese sind gegenüber den basischen Bedingungen der Fmoc-Entschützung stabil und können nach der automatisierten Synthese separat abgespalten werden. Asp wurde als Allylesther (Fmoc-Asp-OAll) mit freier Seitenkettenfunktionalität eingesetzt, um nach der automatisierten Peptidsynthese der restlichen MBP-Sequenz die Allyl-Gruppe durch Tetrakis(triphenylphosphan)-palladium(0) (Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub>) abzuspalten. Anschließend konnte über das freie, N-terminale Amin des MBP und den entschützten C-Terminus von Asp der Ringschluss erfolgen. Die erfolgreiche Zyklisierung wurde durch Kaiser-Tests überprüft, die einen sensitiven Nachweis auf freie Amin-Gruppen liefern. Nach der Entfernung der Bis-N-[1-(4,4-dimethyl-2,6-dioxocyclohexyliden)ethyl] (Dde)-Gruppe vom zusätzlichen Lys (Fmoc-Lys(Dde)-OH) stand eine freie Amin-Seitenkette für die nachträgliche Fam-Funktionalisierung zur Verfügung. Nach Abspaltung vom TentaGel® PAP-Harz wurde das PEG-Konjugat mit zyklischem Peptid-Segment cyc(MBC) erhalten.

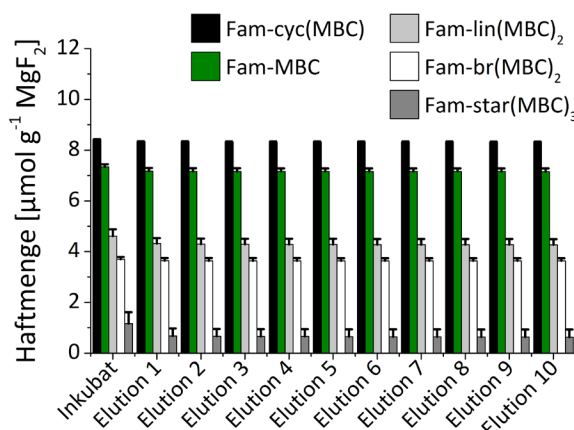
Für weitere Variationen der peptidischen Konjugat-Anteile bei konstantem PEG-Block wurden dimere und trimere Spezies synthetisiert (Abbildung 23), um mögliche Optimierungen bezüglich der Adsorptionsmengen zu erschließen. Zweifache MBP-Motive wurden in linearer ( $\text{lin}(\text{MBC})_2$ ) und verzweigter Form (engl. *branched* MBC,  $\text{br}(\text{MBC})_2$ ) hergestellt. Die Sequenz  $\text{lin}(\text{MBC})_2$  bedurfte keiner besonderen Synthesestrategie abweichend von den Standard-SPPS-Methoden.



**Abbildung 24:** Reaktionsschema zur Synthese des zyklisierten  $\text{cyc}(\text{MBC})$  ausgehend von einem TentaGel® PAP-Harz: (i) Handkupplung von Fmoc-Asp-Oall mit freier Seitenkette, (ii) SPPS von Fmoc-Lys(Dde)-OH und der üblichen MBP-Sequenz, (iii) Allyl-Entschüttung des C-Terminus von Asp, (iv) Ringschluss zwischen dem C-Terminus von Asp und dem N-Terminus von Thr (aus der MBP-Sequenz), (v) Dde-Entschüttung der Lys-Seitenkette gefolgt von einer Fam-Kupplung, (vi) Abspaltung vom Harz und Fällung zum Erhalt des  $\text{cyc}(\text{MBC})$ .

Das Konjugat  $\text{br}(\text{MBC})_2$  hingegen erforderte den Einbau eines zusätzlichen C-terminalen Lysins (Fmoc-Lys(Fmoc)-OH), das nach paralleler Fmoc-Entschüttung eine Verzweigung erlaubt. Die dreifache MBP-Spezies wies durch eine ähnliche Lys-

Verzweigung eine sternähnliche Architektur auf (engl. *star-shaped* MBC,  $\text{star}(\text{MBC})_3$ ). Die erfolgreichen PEG-Konjugatsynthesen wurden mit Hilfe der  $^1\text{H}$ -NMR-Spektroskopie und der Matrix-unterstützten Laser-Desorptions/Ionisations-Flugzeitanalyse (engl. *matrix-assisted laser desorption/ionisation-time 53ff light* (MALDI-ToF)-Massenspektrometrie charakterisiert.

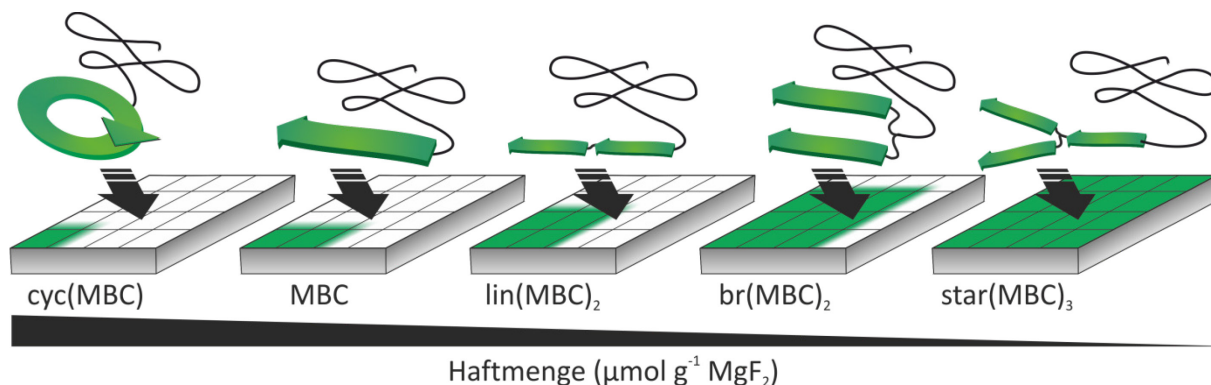


**Abbildung 25:** Adsorption-Elutionsdiagramm von Peptid-PEG-Konjugaten unter Variation der Peptid-Motive (Bedingungen: 0.1 mM Stammlösung in Wasser, 10 mg  $\text{MgF}_2$ -Xerogel, 4 h Inkubation bei RT, Waschschritte mit Wasser).

Mit den hergestellten, Fam-markierten Konjugaten wurden erneut Adsorption-Elutionsversuche durchgeführt (Abbildung 25). Auf Grund der begrenzten Löslichkeit der Konjugate  $\text{br}(\text{MBC})_2$  und  $\text{star}(\text{MBC})_3$  wurde der Vergleich der Hafteigenschaften bei niedrigeren Konzentrationen von 0.1 mM durchgeführt. Damit sind die Haftmengen nicht direkt vergleichbar mit denen aus Abbildung 21, zeigen aber dennoch einen zwischen den Gruppen vergleichbaren Trend. Die irreversible Haftmenge war bei  $\text{cyc}(\text{MBC})$  mit  $(8.31 \pm 0.03) \mu\text{mol g}^{-1}$  am größten, gefolgt vom ursprünglichen MBC mit  $(7.2 \pm 0.1) \mu\text{mol g}^{-1}$ . Die Konjugate mit zweifacher Peptid-Domäne  $\text{lin}(\text{MBC})_2$  und  $\text{br}(\text{MBC})_2$  reihen sich mit  $(4.3 \pm 0.2) \mu\text{mol g}^{-1}$  bzw.  $(3.6 \pm 0.1) \mu\text{mol g}^{-1}$  ein. Die niedrigsten Haftmengen wurden von  $\text{star}(\text{MBC})_3$  erzielt  $((0.6 \pm 0.3) \mu\text{mol g}^{-1})$ . Das Abwaschverhalten aller Konjugate ist mit Mengendifferenzen zwischen 0.1-0.6  $\mu\text{mol g}^{-1}$  gering und damit vergleichbar mit bisherigen Ergebnissen von PEG-Konjugaten.

Ausgehend von diesen Resultaten konnte keine Verbesserung der Haftmengen und damit keine höhere Beschichtungsdichte durch längere, wiederholte Peptid-Motive bei konstanter PEG-Blocklänge festgestellt werden. Stattdessen war ein gegenläufiger Trend zu beobachten, der sich auch in einer alternativ Auftragung in  $\text{mg g}^{-1}$  nicht änderte. Damit sank die Haftmenge nach der Inkubation der  $\text{MgF}_2$ -Partikel mit steigender molarer Masse der Konjugate. An das zunehmende Molekulargewicht sind allerdings noch andere Einflussgrößen gekoppelt, die den Trend der Oberflächenbelegung besser

erklären. Sonst müssten cyc(MBC) und MBC sich entgegengesetzt verhalten, da das Molgewicht von cyc(MBC) mit zwei zusätzlichen Aminosäuren größer ist. Die Einflussgröße, die den Trend am besten beschreibt, ist der räumliche Anspruch der Konjugate in Lösung bzw. die Fläche, die die Konjugate auf der Oberfläche einnehmen. Der Raumbedarf steigt allgemein mit dem Molgewicht. Es kann allerdings Abweichungen durch die unterschiedlichen Konjugat-Architekturen geben. Durch den Ringschluss in zyklischen Peptid-Polymer-Konjugaten ist deren konformative Beweglichkeit stark eingeschränkt.<sup>[155]</sup> Dadurch ist die Dynamik in Lösung geringer und die Bindungsaffinität steigt im Vergleich zur linearen Konformation.<sup>[156]</sup> Außerdem ist der entropische Anteil der Aktivierungsbarriere bei Oberflächenbindungsprozessen von zyklischen Strukturen geringer, weil weniger strukturelle Umordnung vor der Bindung nötig sind. Demnach ist es verständlich, dass eine zyklische Bindungssequenz weniger Platz auf der Oberfläche benötigt und demnach mehr Haftung zeigt. Abbildung 26 veranschaulicht diesen Zusammenhang zwischen Konjugat-Größe/-Volumen und Adhäsionsverhalten.



**Abbildung 26: Sequenzabhängige Adhäsion der Peptid-PEG-Konjugate:** Mit steigendem Platzbedarf der Konjugate nehmen die Haftmengen ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MgF}_2$ ) der Konjugate auf den  $\text{MgF}_2$ -Partikeln ab. Auch die Umrechnung in molare Mengen ( $\text{mg g}^{-1} \text{MgF}_2$ ) ändert diesen Trend nicht.

Ein weiterer Einflussfaktor, der die Substratadhäsion beeinflussen kann, ist die Tendenz von Peptiden und Peptid-Konjugaten zur Selbstaggregation.<sup>[111, 150, 157]</sup> Diese führt zu einer Konkurrenz zwischen intermolekularen Wechselwirkungen und Oberflächenbindungen. Da bereits bei dem reinen Peptid MBP die Neigung zur Hydrogelbildung bei höheren Konzentrationen festgestellt wurde, kann angenommen werden, dass auch bei längeren Peptid-Anteilen in Konjugaten die Aggregationstendenz weiter zunimmt.<sup>[158]</sup> Mit Hilfe der dynamischen Lichtstreuung wurden ausgewählte Konjugate in wässriger Lösung in Abwesenheit von  $\text{MgF}_2$  vermessen, um die Entstehung von Aggregaten zu überprüfen (Abbildung 27). Hierbei wiesen besonders die Konjugate

lin(MBC)<sub>2</sub> und star(MBC)<sub>3</sub> mit längerem Peptid-Block größere hydrodynamische Aggregatdurchmesser auf als Konjugate mit einfacher Peptid-Sequenz. Dies unterstreicht die Tendenz zur Aggregatbildung dieser Biohybride. Die Selbstaggregation kann dazu führen, dass weniger Konjugate effektiv in Lösung für die Beschichtung der Partikeloberflächen zur Verfügung stehen, was möglicherweise einen weiteren Grund für die abnehmenden Haftmengen bei Konjugaten mit längeren Peptid-Anteilen (Abbildung 25) darstellt.

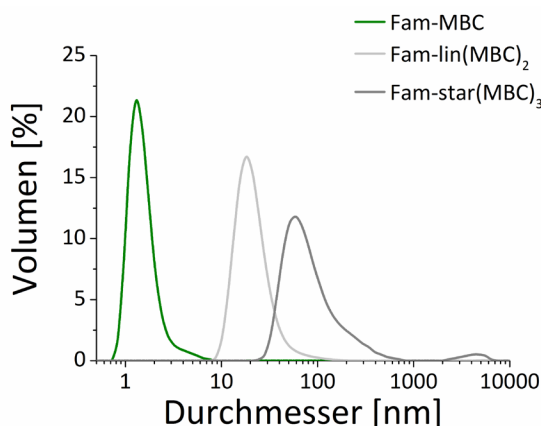


Abbildung 27: Größenverteilung der hydrodynamischen Durchmesser verschiedener Konjugate in Lösung nach DLS: Mit steigendem Peptid-Anteil in den Konjugaten sind größere Aggregate erkennbar (Bedingungen: 0.1 mM in Wasser (Konzentration vor Filtration), filtriert durch 0.45 µm Nylon-Spritzenfilter).

#### 3.1.1.4 PEG-Blocklängenabhängige Haftung

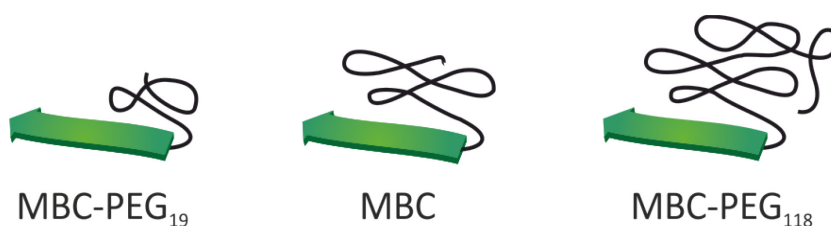
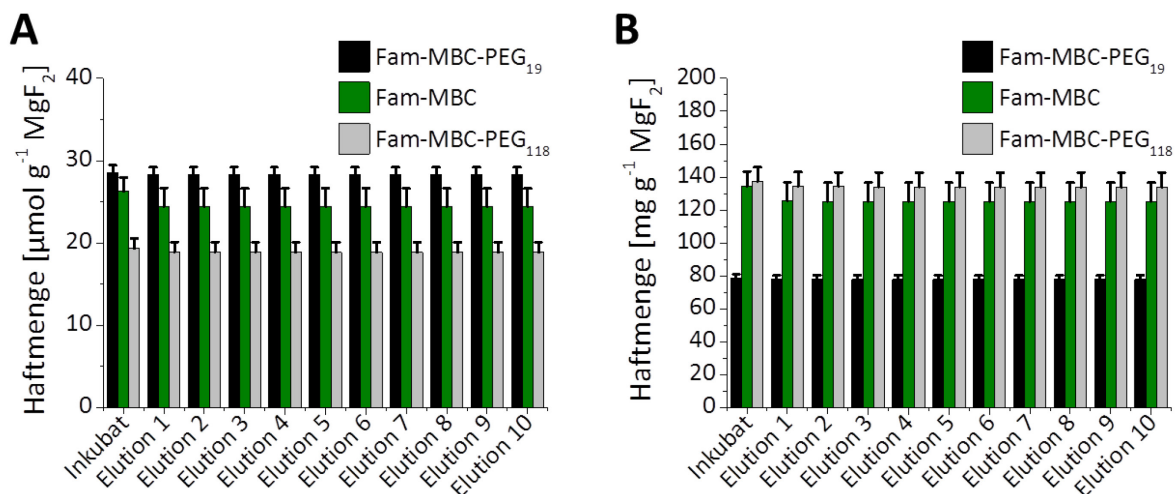


Abbildung 28: Peptid-PEG-Konjugate zur Untersuchung der Struktur-Eigenschaftsbeziehungen bei der Adhäsion: PEG-Blocklängenabhängigkeit mit kurzem Block (DP<sub>n</sub> = 19, MBC-PEG<sub>19</sub>), standardmäßig verwendetem MBC (DP<sub>n</sub> = 73) und langem Block (DP<sub>n</sub> = 118, MBC-PEG<sub>118</sub>).

Eine weitere Kenngröße der Konjugate ist die Länge bzw. das Molekulargewicht des Polymer-Blocks. Deshalb wurden Konjugate mit unterschiedlich langen PEG-Blöcken hergestellt. Das kurze Konjugat trug einen  $8.5 \cdot 10^2 \text{ g mol}^{-1}$  PEG-Block ( $M_n$ ; engl. *degree of polymerization* (dt. Polymerisationsgrad) DP<sub>n</sub> = 19, MBC<sub>19</sub>). Das bereits beschriebene MBC wies beim PEG-Anteil eine molare Masse von  $M_n = 3.2 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  (DP<sub>n</sub> = 73) und die längere Spezies einen Polymer-Teil von  $M_n = 5.2 \cdot 10^3 \text{ g mol}^{-1}$  (DP<sub>n</sub> = 118, MBC<sub>118</sub>) auf (Abbildung 28). Bei den Synthesen kamen TentaGel® PAP-Harze unterschiedlicher



Polymerlängen zum Einsatz. In Adsorption-Elutionstests wurden für MBC<sub>19</sub> mit  $(28.3 \pm 0.9) \mu\text{mol g}^{-1}$  die größte molare Haftmenge gemessen (Abbildung 29 A). Beim verlängerten MBC<sub>118</sub> adhärten dagegen nur  $(19 \pm 1) \mu\text{mol g}^{-1}$ , während das schon früher gemessene MBC bei  $(24 \pm 2) \mu\text{mol g}^{-1}$  rangierte. Damit bestätigte sich grundsätzlich der Trend, dass die finalen Haftmengen sehr stark vom räumlichen Anspruch der Konjugate abhängen (Abbildung 30). Es gab allerdings einen Unterschied im Vergleich zum Trend der Peptide. Wird die Haftmenge in  $\text{mg g}^{-1}$  umgerechnet, kehrt der Trend sich in dieser Darstellung um (Abbildung 29 B). Nach der Umrechnung lieferte MBC<sub>19</sub> stabile Beschichtungen von  $(78 \pm 2) \text{mg g}^{-1}$ . MBC<sub>118</sub> haftete mit  $(134 \pm 9) \text{mg g}^{-1}$  nach Masse demnach am meisten, allerdings kaum mehr als das Ausgangskonjugat MBC mit  $(130 \pm 10) \text{mg g}^{-1}$ . Dies deckt sich mit Erkenntnissen aus Arbeiten für andere Substrate.<sup>[159]</sup>

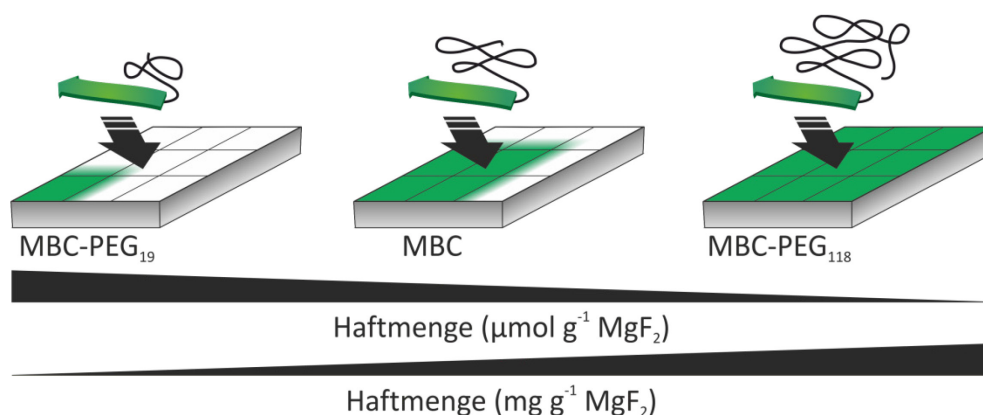


**Abbildung 29:** Adsorption-Elutionsdiagramm von Peptid-PEG-Konjugaten mit Variation der Polymer-Blocklänge aufgetragen in (A)  $\mu\text{mol g}^{-1}$  und (B) in  $\text{mg g}^{-1}$  (Bedingungen: 0.5 mM Stammlösung in Wasser, 10 mg  $\text{MgF}_2$ -Xerogel, 4 h Inkubation bei RT, Waschstschritte mit Wasser).

Mit sinkendem Platzanspruch der PEG-Blöcke der Konjugate, lässt sich demnach die Anzahl der bindenden Makromoleküle erhöhen (Abbildung 30). Dementsprechend ist anzunehmen, dass bei kleineren Konjugaten höhere Packungsdichten erreicht werden. Wie im vorherigen Abschnitt erläutert können größere Peptid-Anteile hingegen zur Selbstaggregation neigen, was die Effektivität dieser sequenzvariierten Konjugate für Beschichtungen einschränkt. Auch die niedrigere Löslichkeit bedingt durch die größeren Peptid-Anteile kann die Konjugat-Menge, die für die Beschichtung zur Verfügung steht, reduzieren. Wenn sich die Kosten und der Aufwand der Herstellung von Peptid-Polymer-Konjugaten mit längeren Polymer-Blöcken kaum unterscheiden, sind Konjugate mit längeren Polymer-Teilen vielversprechende Alternativen für Antifouling-



Anwendungen. Auch die zyklisierte Sequenz cyc(MBC) zeigte eine Tendenz zu effektiven Beschichtungen mit hoher Packungsdichte, sodass sich weitere Untersuchungen zyklisierter Strukturen für Oberflächenadhäsionen anbieten. In dieser Arbeit stellte sich allerdings MBC als bestes System dar, weil es unabhängig von der Auftragung ( $\mu\text{mol}$  vs.  $\text{mg}$ ) mit die größten, irreversiblen Haftmengen lieferte. Außerdem ist es wegen des fehlenden Zyklisierungsschritts synthetisch weniger aufwendig als das zyklische cyc(MBC). Auf Grund des verwendeten TentaGel® PAP-Harzes ( $M_n = 3200 \text{ g mol}^{-1}$ ) war es außerdem kosteneffizienter als das MBC<sub>119</sub>, das im hiesigen Fall ein speziell angefertigtes PAP-Harz benötigte.

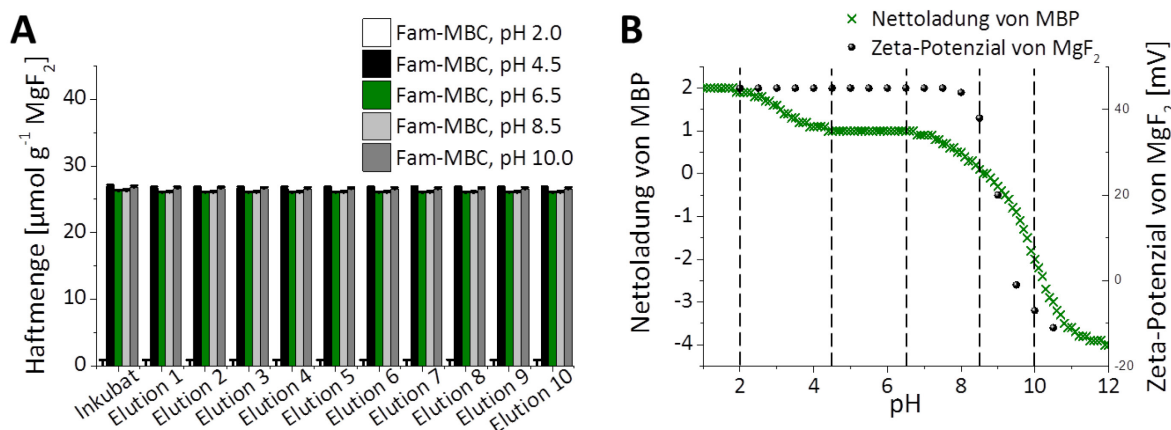


**Abbildung 30: PEG-Blocklängenabhängige Adhäsion der Peptid-PEG-Konjugate:** Mit steigendem Platzbedarf der Konjugate nehmen die molaren Haftmengen ( $\mu\text{mol g}^{-1} \text{MgF}_2$ ) der Konjugate auf den  $\text{MgF}_2$ -Partikeln ab. Bei der Umrechnung in massenbezogene Haftmengen ( $\text{mg g}^{-1} \text{MgF}_2$ ) kehrt der Trend sich auf Grund der großen Molmassenunterschiede um.

### 3.1.1.5 pH-abhängige Haftung

Bisher wurden die Adsorptionsprozesse unter milden Bedingungen ohne aktive Variation des pH-Werts untersucht. Für alle Lösungen wurde deionisiertes Wasser verwendet, dessen ursprünglicher pH-Wert leicht unterhalb des Neutralpunktes lag. Da innerhalb des Phagen-Display-Protokolls die stärker bindenden Phagen unter stark sauren Bedingungen bei pH 2 eluiert werden, wurde der Einfluss des pH-Werts auf die Haftmengen untersucht. Für die biologisch aktiven Phagen war es notwendig, einen physiologischen pH-Wert ( $\text{pH} \sim 7.4$ ) aufrechtzuerhalten. Für Materialanwendungen ist das allerdings irrelevant. Außerdem kann die Variation des pH-Wertes Aufschluss über die Art der Bindungen zwischen Peptid und  $\text{MgF}_2$  liefern. Auf die Verwendung von wässrigen Puffern wurde bewusst verzichtet, weil sonst mit dem pH-Wert gleichzeitig die Salzfracht und die Ionenstärke variiert worden wären. Weitere Adsorption-

Elutionsversuche mit MBC wurden dazu in Wasser unterschiedlich eingestellter pH-Werte durchgeführt (pH 2.0, 4.5, 6.5, 8.5 und 10.0, Abbildung 31 A).



**Abbildung 31:** (A) Adsorption-Elutionsdiagramm von MBC bei verschiedenen pH-Werten (Bedingungen: 0.5 mM Stammlösung in Wasser mit voreingestelltem pH-Wert, 10 mg  $\text{MgF}_2$ -Xerogel, 4 h Inkubation bei RT, Waschstapen mit Wasser mit voreingestelltem pH-Wert). (B) pH-Abhängigkeiten von Peptid und Substrat: Berechnete Nettoladungen von MBP (grüne Kreuze) und  $\zeta$ -Potenzial-pH-Titration von nanokristallinem  $\text{MgF}_2$  (schwarze Punkte, Werte des sigmoidalen Fits abgeschätzt aus Ref. <sup>[160]</sup>).

Die Haftmengen entsprachen zwischen pH 4.5 - 10.0 den Resultaten von MBC in unbehandeltem, deionisiertem Wasser (Abbildung 21). In diesem pH-Bereich unterscheiden sich die stabilen Beschichtungswerte zwischen minimal  $(26.0 \pm 0.2) \mu\text{mol g}^{-1}$  und maximal  $(27 \pm 2) \mu\text{mol g}^{-1}$  für die vier Versuchsgruppen kaum voneinander. Einzig die Messungen bei pH 2.0 zeigen mit  $(0.0 \pm 0.9) \mu\text{mol g}^{-1}$  praktisch keine Haftung von MBC mehr. Das bestätigt die Elutionsparameter des Phagen-Display-Protokolls, weil das Ansäuern auf pH 2.0 und die folglich sehr starke Protonierung die Wechselwirkungen zwischen Peptiden und Zieloberfläche vollständig eliminiert. Die sehr ähnlichen Ergebnisse für MBC-Haftmengen bei pH-Werten bis zu pH 10.0 lassen Rückschlüsse auf die vorherrschenden Wechselwirkungsarten zu. Nach Betrachtung der pH-abhängigen Nettoladungen der Peptide (isoelektrischer Punkt  $pI = 8.7$ ) und der  $\text{MgF}_2$ -Oberfläche (Abbildung 31 B) war zu beobachten, dass erst ab etwa pH 8 große Veränderungen bei der Peptid-Ladung und beim  $\zeta$ -Potenzial der  $\text{MgF}_2$ -Partikel eintreten. Die Tatsache, dass das bei allen pH-Werten < 8 positiv geladene Peptid (Nettoladung +1/+2) mit einer Oberfläche mit positivem  $\zeta$ -Potenzial wechselwirkt (+45 mV),<sup>[160]</sup> macht deutlich, dass eine rational unerwartete, komplexe Bindungssituation vorliegt. Zuvor wurden vorwiegend elektrostatische Brönstedt-Säure/Base- und WSB-Wechselwirkungen in Betracht gezogen.<sup>[140]</sup> Da die Haftmengen über einen weiten pH-Bereich derart konstant sind und auch bei pH 8.5 und pH 10.0 nicht abnehmen, verlieren diese Bindungsmechanismen in diesem speziellen Fall an Bedeutung. Ionische

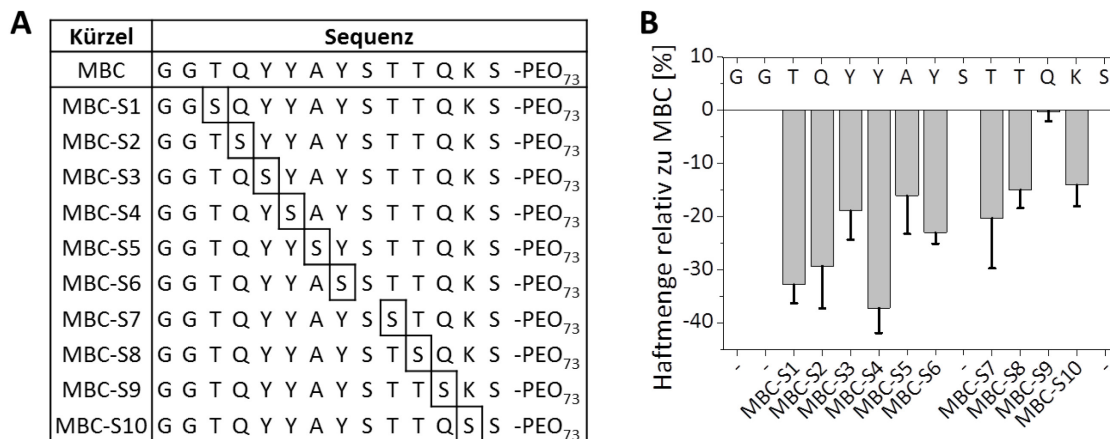
Bindungen rücken hingegen in den Vordergrund, weil die Haftung erst minimiert wurde, wenn alle negativ geladenen Funktionalitäten sowohl im Peptid als auch auf der  $\text{MgF}_2$ -Oberfläche (inklusive Sauerstoff-haltiger Verunreinigungen) bei pH 2 komplett protoniert waren. Dafür sind Lewis-Säure/Base-Gleichgewichte zwischen protonierten Hydroxid-Gruppen im Peptid und den leicht Lewis-sauren Mg-Zentren weiterhin plausibel. Auch hydrophobe und van-der-Waals-Wechselwirkungen sowie  $\pi$ -Effekte sind nicht ausgeschlossen. Diese drei Bindungsarten werden zwar ebenfalls durch pH-abhängige Änderungen der Konformation oder der elektronischen Struktur beeinflusst, aber tendenziell weniger als z. B. Brönstedt-Säure/Base-Gleichgewichte. Durch einfache, pH-abhängige Messungen konnten damit die vorherrschenden Wechselwirkungsarten eingegrenzt werden. Somit scheint die Präferenz von MBC auf  $\text{MgF}_2$  durch die Hydroxid- und  $\pi$ -System-reiche (3 Thr, 2 Ser, 3 Tyr) Zusammensetzung verständlich.

### 3.1.1.6 Aminosäurenabhängige Haftung

Ein weiteres Mittel zur Analyse der Struktur-Eigenschaftsbeziehungen der Peptid-Adhäsion ist der systematische Austausch der einzelnen Aminosäuren in der Peptid-Sequenz. Bei dieser Methode liegt der Fokus neben der Art der Wechselwirkungen auf der Positionen der Aminosäuren. Als alternierende Aminosäure wurde Ser gewählt, weil die Sequenz in MBC viele Hydroxy-Gruppen enthält, welche als wichtig für die Bindung eingeschätzt werden. Die variierten Sequenzen, mit denen analog zu den vorigen Studien Adsorption-Elutionsversuche durchgeführt wurden, sind in Abbildung 32 A beschrieben. Die stabilen Haftmengen der variierten Konjugate mit Ser an Position # (MBC-S#, mit # = 1-10) sind als prozentuale Veränderung zum Original MBC aufgetragen (Abbildung 32 B). Negative Werte bedeuten, dass der Ersatz der Aminosäure an der entsprechenden Position durch Ser zu geringeren Adsorptionsmengen führte. Somit lassen sich für die Adhäsion wichtige Aminosäuren an den entsprechenden Positionen in der Ursprungssequenz identifizieren.

Durch die Messungen wurde erneut die Bedeutung des Phagen-Displays für die Selektion der Peptide deutlich. Auch wenn eine Hydroxid-tragende Aminosäure als Substituent angeboten wurde, konnte diese an keiner Stelle die Adsorptionsmenge verbessern. Lediglich bei Gln an Position 12 ( $\text{Q}^{12}$ ) verringerte sich die Haftmenge nicht.  $\text{Q}^{12}$  scheint damit für die Bindung keine entscheidende Rolle zu spielen oder dessen Bindungsanteile werden durch S gleichwertig ersetzt. Besonders starke Abnahmen der

Haftmengen waren bei T<sup>3</sup>, Q<sup>4</sup> und Y<sup>6</sup> mit -33%, -29% bzw. -37% zu verzeichnen. Die Aminosäurebausteine an diesen Positionen sind folglich für die Adhäsion von großer Bedeutung. Da auch der Austausch an den Positionen Y<sup>5</sup>, A<sup>7</sup> und Y<sup>8</sup> einen negativen Effekt ausübte, scheint besonders der *N*-terminale Teil der Sequenzen für die Haftung wichtig zu sein.

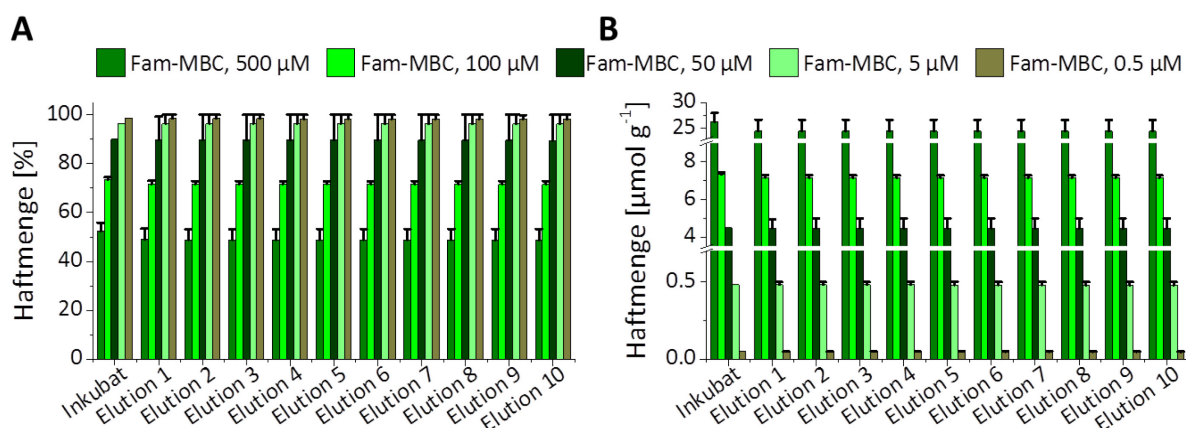


**Abbildung 32: Sequenzvariation des MBC-Konjugats (Ser-Scan): (A) Liste der Sequenzen, bei denen sukzessive Ser an verschiedenen Positionen eingebaut wurde. (B) Veränderungen der irreversiblen Haftmengen der Konjugate MBC-S# (MBC-Serin an Position #) relativ zur Haftmenge von MBC.**

Dieses Ergebnis erklärt sich daraus, dass die *N*-Termini der Peptide an der Oberfläche der Bakteriophagen im Phagen-Display die zugänglichsten Bereiche darstellen, weil die Peptide *C*-terminal an den Phagen gebunden sind. Außerdem ist bereits literaturbekannt, dass nur bestimmte Abschnitte in Peptiden und Proteinen die wirksame Bindungsdomäne ausmachen, welche stark durch Nachbarschaftseffekte und die räumliche Faltung der Sequenz beeinflusst wird.<sup>[137d]</sup> Die Ser-Substitution hat zusätzlich einen Einfluss auf dem Raumbedarf der Konjugate. Ser, das einen geringeren sterischen Anspruch hat als die meisten anderen ausgetauschten Aminosäuren, macht die Struktur in Lösung flexibler. Die Bedeutung der positionsabhängigen Adsorption macht sich auch in Folgeanwendungen bemerkbar. In einer zeitgleich verlaufenden Arbeit, die diesen Ser-Scan als MgF<sub>2</sub>-Kompatibilisator in modellhaften PEO/MgF<sub>2</sub>-Kompositen einsetzte, wurden Unterschiede im Verhalten der resultierenden Kompositmaterialien gefunden.<sup>[161]</sup> Für MBC-S1 (T<sup>3</sup>), MBC-S2 (Q<sup>4</sup>), MBC-S3 (Y<sup>5</sup>), MBC-S4 (Y<sup>6</sup>) und MBC-S6 (Y<sup>8</sup>) zeigten sich Veränderungen in den Oberflächenmorphologien der heißgepressten Kompositfilme sowie Verschlechterungen der mechanischen Eigenschaften der Materialien, die sich in geringeren Elastizitätsmoduln ausdrückten (unveröffentlichte Ergebnisse von V. Samsoninkova, AK Prof. Börner, SALSA/HU Berlin).

### 3.1.1.7 Konzentrationsabhängige Haftung und Bindungsaffinität

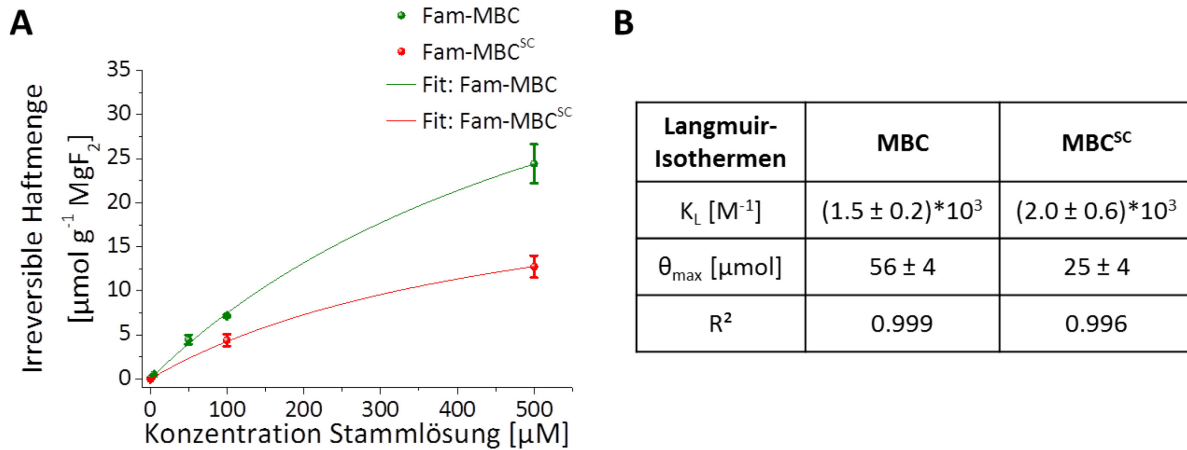
Je nach Anwendung werden unterschiedliche Anforderungen an Oberflächenbeschichtungen gestellt. Teilweise sind besonders hohe Packungsdichten der Beschichtung für Folgebeschichtungen erforderlich.<sup>[162]</sup> In anderen Fällen reichen geringere Belegungen aus oder es soll sogar nur unvollständig beschichtet werden, um bereits vorhandene Funktionalitäten lediglich zu reduzieren.<sup>[163]</sup> Außerdem ist es wünschenswert, die adsorbierenden Spezies effizienter einzusetzen. Bei Konzentrationen aller bisherigen Versuche wurden zwischen ca. 50% (0.5 mM MBC) bis hin zu 90% (0.1 mM star(MBC)<sub>3</sub>) der Stammlösung wieder abgewaschen. Die Variation der Konzentration der Stammlösung sollte ein besseres Verständnis und daraus resultierend eine größere Kontrolle der prozentualen Haftmengen ermöglichen. Zu diesem Zweck wurden Stammlösungen verschiedener Konjugat-Konzentrationen für die Adhäsion angeboten. Die Auswertung der Adsorption-Elutionsexperimente sind in Abbildung 33 dargestellt.



**Abbildung 33:** Adsorption-Elutionsdiagramm von Peptid-PEG-Konjugaten unter Variation der Konjugat-Konzentration aufgetragen (A) in Prozent bezogen auf die Ausgangskonzentration der Stammlösung und (B) in  $\mu\text{mol g}^{-1}$  (Bedingungen: Stammlösung in Wasser, 10 mg  $\text{MgF}_2$ -Xerogel, 4 h Inkubation bei RT, Waschschrte mit Wasser).

Mit sinkender Konzentration der Stammlösung stieg die prozentuale Haftmenge an (Abbildung 33 A). Von anfänglich ( $49 \pm 4$ )% bei 0.5 mM MBC nahmen die relativen Haftmengen sukzessive auf ( $98 \pm 2$ )% bei 0.5  $\mu\text{M}$  MBC in der Stammlösung zu. Die Überschussmenge des eingesetzten Konjugats konnte somit bis zu einem annähernd vollständigen Umsatz reduziert werden. Mit dem Anstieg der prozentualen Haftmengen sanken die molaren Mengen, die auf den Partikeln adhärten (Abbildung 33 B). Die absoluten Mengen der Versuche ausgehend von 0.5 mM und 0.1 mM Stammlösungen wurden bereits beschrieben. Die niedrigeren Konzentrationen von 50  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und

0.5  $\mu\text{M}$  lieferten kleinere Haftmengen von  $(4.5 \pm 0.5) \mu\text{mol g}^{-1}$ ,  $(480 \pm 20) \text{nmol g}^{-1}$  und  $(49.1 \pm 0.9) \text{nmol g}^{-1}$ . Dieses konzentrationsabhängige Verhalten ist üblich für Beschichtungsverfahren und kann durch etablierte Modelle wie Isothermen nach Langmuir beschrieben werden.<sup>[138]</sup> Dabei handelt es sich um ein vereinfachtes Modell, das isoenergetische, voneinander unabhängige Bindungsstellen annimmt. Außerdem kann es über die Langmuir-Konstante  $K_L$  einen Einblick in die Affinität der Substrat-Bindung und die Haftmenge einer theoretischen Monolage  $\theta_{\text{max}}$  liefern.



**Abbildung 34:** Langmuir-Isothermen aus konzentrationsabhängigen Adsorption-Elutionsversuchen: (A) Irreversible Haftmengen der Konjugate MBC und MBC<sup>SC</sup> angepasst mit Hilfe von Langmuir-Isothermen (Gleichung 2). (B) Fitparameter  $K_L$  (Langmuir-Konstante),  $\theta_{\text{max}}$  (Haftmenge einer Monolage) und  $R^2$  (Bestimmtheitsmaß der Fit-Funktion) der Langmuir-Isothermen.

$$\theta = \frac{\theta_{\text{max}} K_L c}{1 + K_L c} \text{ mit } K_L = \frac{k_{\text{Ads}}}{k_{\text{Des}}} \quad (\text{Gleichung 2})$$

Nach Gleichung 2, die den Belegungsgrad (= molare irreversible Haftmenge)  $\theta$  einer Oberfläche in Abhängigkeit der Konzentration  $c$  beschreibt, kann das Verhalten von MBC und MBC<sup>SC</sup> verglichen werden (Abbildung 34). Daraus lässt sich schließen, dass ein steigender Konzentrationsdruck in Lösung sich ähnlich auswirkt wie bei der Belegung von Oberflächen mit Molekülen aus der Gasphase, wofür die Langmuir-Isotherme ursprünglich entwickelt wurde.<sup>[62]</sup> Danach steigt in der Regel die absolute Haftmenge durch eine höhere Ausgangskonzentration an.  $K_L$  als Quotient aus den Geschwindigkeitskonstanten für die Adsorption  $k_{\text{Ads}}$  und die Desorption  $k_{\text{Des}}$  wird häufig als Maß für die Affinität eines Adsorbens für ein Zielsubstrat verwendet (Gleichung 2).<sup>[164]</sup> MBC wies mit  $(1.5 \pm 0.2) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1}$  eine niedrigere Affinität zu  $\text{MgF}_2$  auf als das randomisierte Konjugat MBC<sup>SC</sup>  $((2.0 \pm 0.6) \cdot 10^3 \text{ M}^{-1})$ . Jedoch befanden sich wie bereits in Abbildung 21 beschrieben bei MBC mehr als doppelt so viele Konjugate auf der Oberfläche, was sich in den  $\theta_{\text{max}}$ -Werten widerspiegelt. Die Effektivität der Adhäsion hängt folglich nicht nur von der Affinität der Konjugate für die Oberfläche, sondern auch

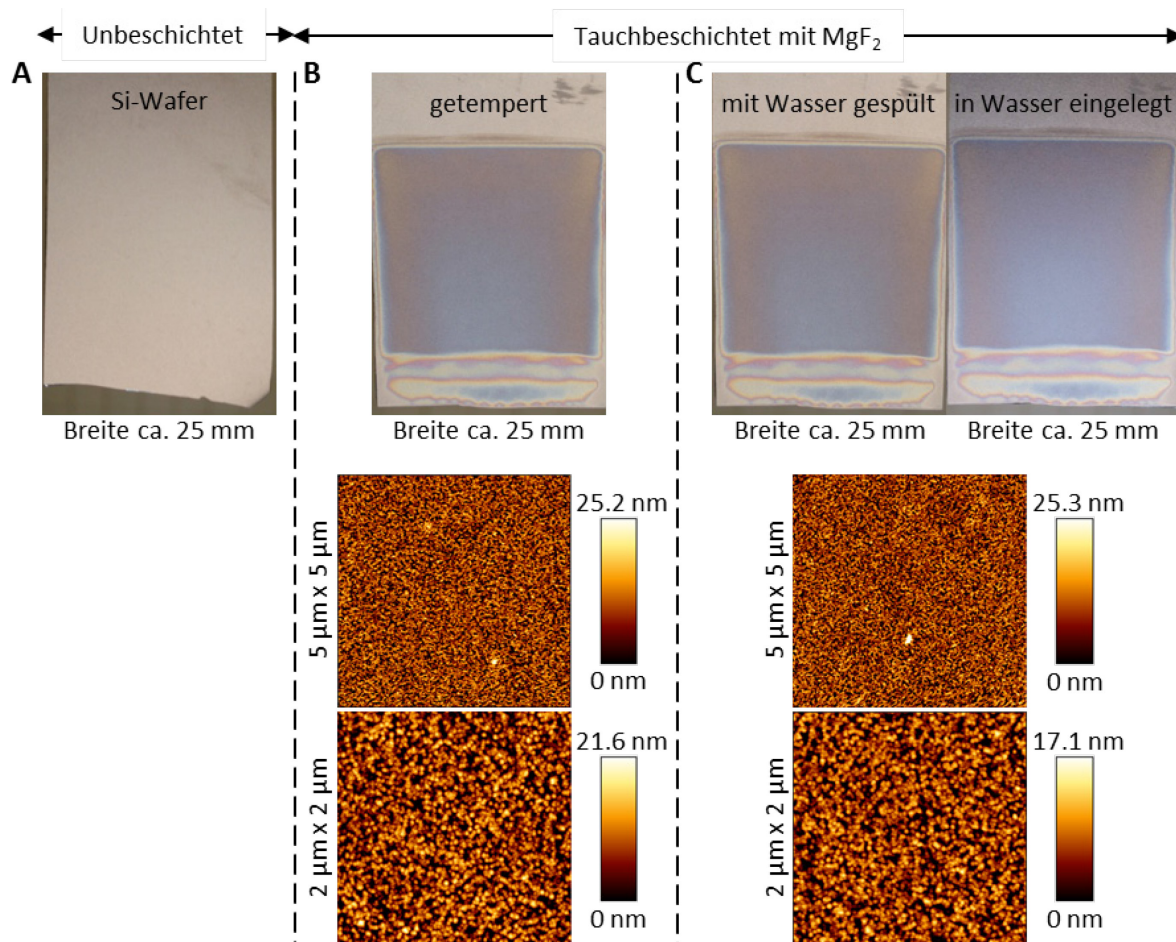
von der Packungsdichte ab, die sich bei der selbst organisierten Beschichtung erreichen lässt.

Nach diesem unerwarteten Ergebnis wurde die Peptid-Haftung auf einer  $\text{MgF}_2$ -Oberfläche in einer Kooperation mit Melis Göktaş (Gruppe von Dr. K. Blank, MPI-KG, Golm, GER) mit Hilfe der Einzelmolekülkraftspektroskopie (SMFS) untersucht. Die SMFS bietet die Möglichkeit, Bindungsstärken einzelner Peptidmoleküle auf molekularer Ebene zu ermitteln. Die Bindungskräfte sind demnach ein Maß für die Affinität der Adhäsion, weil sie das Adsorption-Desorption-Gleichgewicht beeinflussen, das durch eine Affinitätskonstante (analog zu  $K_L$  in Gleichung 2) beschrieben wird. Da diese Einzelmolekül-Technik auf der Rasterkraftmikroskopie basiert, muss sowohl ein AFM-Cantilever mit der zu untersuchenden MBP-Sequenz funktionalisiert und  $\text{MgF}_2$  auf ein ebenes Substrat aufgebracht werden. Ersteres geschah über eine chemoselektive Kupplungsstrategie zwischen der Maleimid-funktionalisierten Cantilever-Oberfläche und Thiol-Gruppen von Cys-funktionalisiertem MBP.<sup>[165]</sup> Zwischen der Maleimid-Gruppe und dem Cantilever wurde ein PEO-Abstandhalter ( $M_n = 50$  kDa) eingebracht, der eine ausreichende Flexibilität des Peptids bei den Bindungsexperimenten gewährleistet. Die Thiol-Modifikation von MBP wurde analog zu den Peptid-PEG-Konjugaten C-terminal eingeführt, sodass es als MBP-Cys ( $H\text{-GG-TQYYAYSTTQKS-GGC-NH}_2$ ) eingesetzt werden konnte. Die für die SMFS verwendeten Peptide wurden durch präparative Flüssigkeitschromatographie (engl. *preparative high-performance liquid chromatography*, prep-HPLC) aufgereinigt. Vor der Cantilever-Funktionalisierung wurden eventuell vorhandene Disulfid-Brücken reduziert. Die Messungen wurden zur besseren Vergleichbarkeit mit den Adsorption-Elutionsuntersuchungen unter wässrigen Bedingungen innerhalb eines Wassertropfens durchgeführt.

Als AFM-Substrat diente ein Silizium-Wafer, der durch Tauchbeschichtung (*dip-coating*) mit unmodifiziertem  $\text{MgF}_2$ -Sol beschichtet wurde. Dazu wurde ein Wafer-Schnitt in das Sol eingetaucht und mit konstanter Zuggeschwindigkeit wieder herausgezogen. Dabei evaporierte das Lösungsmittel und  $\text{MgF}_2$  wurde auf dem Substrat abgeschieden. Anschließend wurde diese vorläufige Schicht bei 500 °C getempert, wodurch sich die Schicht verdichtete und auf dem Substrat stabilisierte.<sup>[88a]</sup> Die quadratische Rauheit der Schicht betrug  $R_q = 5.3$  nm, was einer homogenen, sehr ebenen Beschichtung entspricht. Während initialer Testmessungen auf anders präparierten Glas/ $\text{MgF}_2$ -Substraten wurde eine mangelnde Stabilität der Beschichtung gegenüber Wasser festgestellt, wodurch SMFS-Messungen unmöglich wurden. Dieses Problem



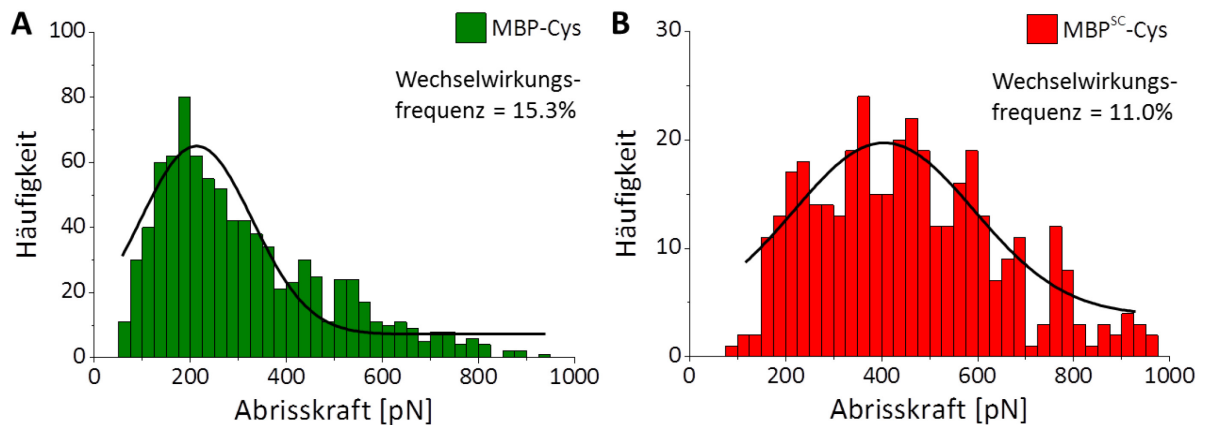
konnte durch die Untersuchung der Wasserresistenz der tauchbeschichteten, getemperten Wafer ausgeschlossen werden. Die getemperte  $\text{MgF}_2$ -Schicht auf dem Silizium-Wafer erwies sich als stabil genug für die SMFS, weil sie sich nicht durch Spülschritte oder das Einlegen in Wasser ablöste, was Photographien und AFM-Aufnahmen bestätigten (Abbildung 35). Auch die unveränderte Rauheit  $R_q$  von 5.3 nm spricht für eine ausreichende Wasserstabilität.



**Abbildung 35:** Nachweis der Beschichtungshomogenität und der Wasserresistenz von  $\text{MgF}_2$ -Schichten für die SMFS: (A) Photographie eines unbeschichteten Si-Wafers. (B, C) Photographie (oben) und AFM-Aufnahmen (unten) eines  $\text{MgF}_2$ -beschichteten Si-Wafers (B) nach Tempern bei 500 °C und (C) nach Tempern und Spülen mit 500 mL Wasser bzw. nach Einlegen in Wasser über Nacht. Die quadratische Rauheit betrug sowohl vor als auch nach Einlegen in Wasser  $R_q = 5.3$  nm.

Während der Peptid-funktionalisierte Cantilever an die  $\text{MgF}_2$ -Oberfläche angenähert und anschließend wieder entfernt wurde, konnten die auftretenden Kräfte gemessen werden. Die Entfernung des Cantilevers vom Substrat mit konstanter Geschwindigkeit resultiert in Abrissereignissen, die charakteristische Kräfte aufweisen. Quantitative Aussagen über diese Abrissvorgänge stammen aus der statistischen Auswertung mehrerer hundert Einzelvorgänge. Die Ergebnisse für MBP-Cys und die analog vorbereitete Referenz  $\text{MBP}^{\text{SC}}$ -Cys sind in Abbildung 36 zusammengestellt.





**Abbildung 36:** Histogramme der SMFS-Abrisskräfte der Peptide (A) MBP-Cys und (B) MBP<sup>SC</sup>-Cys auf MgF<sub>2</sub>-beschichteten Wafern unter wässrigen Bedingungen: Die wahrscheinlichsten Abrisskräfte wurden durch Anpassungskurven angenähert (Bedingungen: Messungen in Wasser bei 1.0  $\mu\text{m s}^{-1}$ , Wechselwirkungs-frequenz = relative Häufigkeit der erfolgreichen Abrissereignisse verglichen mit der Gesamtzahl der Annäherungszyklen).

Die Ergebnisse zeigen, dass nicht das im Phagen-Display selektierte MBP die stärkere Bindung zum MgF<sub>2</sub>-Substrat aufwies. Die Anpassung der akkumulierten Abrisskräfte von MBP-Cys ergab 202 pN als wahrscheinlichste Abrisskraft (bei 1.0  $\mu\text{m s}^{-1}$  Entfernungsgeschwindigkeit). Die variierte Sequenz MBP<sup>SC</sup>-Cys zeigte unter den gleichen Bedingungen hingegen 396 pN als wahrscheinlichste Abrisskraft, wobei die Verteilungsbreite sehr groß war. Die Verteilung der Abrisskräfte von MBP-Cys war deutlich schmaler, was für eine Oberflächenanbindung durch immer dieselbe Bindungsdomäne im Peptid spricht. Werte dieser Größenordnung sind üblich für Peptide aus kanonischen Aminosäuren, die für anorganische Oberflächen selektiert wurden, während modifizierte Peptide Abrisskräfte bis in den niedrigen nN-Bereich erreichen können (z.B. DOPA-haltige Sequenzen auf Aluminiumoxid).<sup>[4c, 166]</sup> Die Wechselwirkungs-frequenz als relative Häufigkeit, mit der die Einzelmessvorgänge auswertbare Abrissereignisse lieferten, unterschied sich mit 15% bzw. 11% nur wenig für MBP-Cys und MBP<sup>SC</sup>-Cys. Referenzexperimente mit unfunktionalisierten PEO-Ketten am Cantilever wiesen geringere Abrisskräfte auf und hatten mit 2% nur eine sehr geringe Wechselwirkungs-frequenz, sodass keine statistische Auswertung möglich war (Anhang, Abbildung A1).

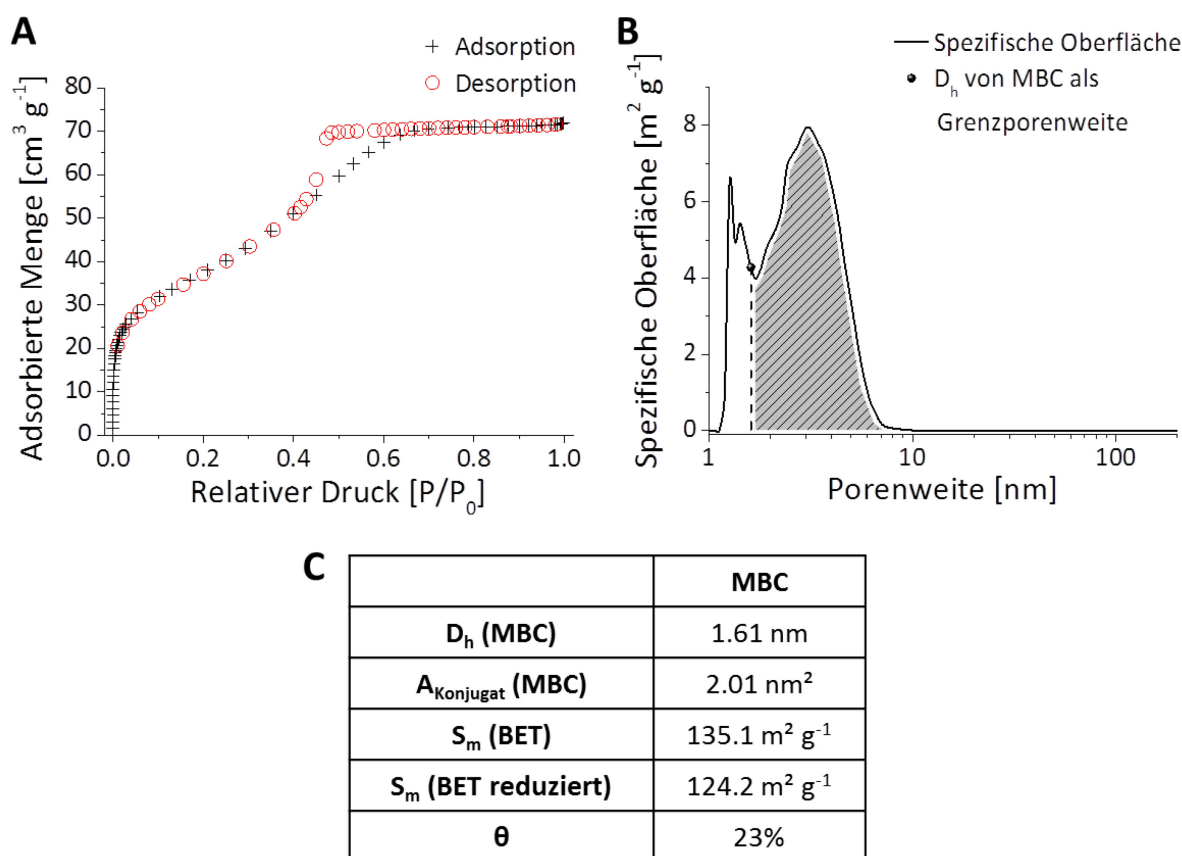
An dieser Stelle kann vermutet werden, dass beide Peptide sich in der Bindungswahrscheinlichkeit unterscheiden. MBP-Cys scheint mehr Bindungsstellen zu finden, was zu einer besser abgeschirmten Oberfläche führte. MBP<sup>SC</sup>-Cys bindet im höherenergetischen Bereich, allerdings weniger häufig. Diese Resultate unterstützen die Erkenntnisse über die Affinitäten aus den Langmuir-Konstanten. Die höhere Affinität

bzw. eine stärkere Bindung zu  $\text{MgF}_2$  ist folglich nicht die bestimmende Größe für eine partikelstabilisierende Beschichtung. Die absolute Haftmenge, die sich auf der Oberfläche anlagern lässt, scheint für die Materialeigenschaften entscheidender zu sein, was sich in der hinreichenden Stabilisierung von MBC-stabilisierten  $\text{MgF}_2$ -Nanopartikeln in Wasser und Methanol äußerte (siehe Kapitel 3.1.2).

### 3.1.1.8 Oberflächenbelegung

Ausgehend von den neuen Erkenntnissen, dass die Packungsdichte der Konjugate für eine effektive Stabilisierung mitverantwortlich ist, wurde die Oberflächenbelegung des  $\text{MgF}_2$ -Xerogels durch die Konjugate berechnet. Bisher war es auf Grund der undefinierten Porosität des Xerogels problematisch, die tatsächlich für die Konjugate zugängliche  $\text{MgF}_2$ -Oberfläche zu bestimmen.<sup>[140]</sup> Frühere Abschätzungen basieren auf SEM-Aufnahmen der Partikel, bei denen die Partikel als unporöse, dichte Kugeln angenommen wurden.<sup>[146]</sup> Diese unterschätzten die spezifischen Oberflächen erheblich. Berechnungen, die auf BET-Oberflächen beruhen, sind für poröse Systeme besser geeignet. Dabei ist zu beachten, dass Stickstoff-Moleküle auf Grund der geringeren Größe in engere Poren vordringen können als Konjugate. Somit lieferten unkorrigierte Stickstoff-BET-Oberflächen zu große spezifische Oberflächen. Um eine bessere Näherung für die zugängliche spezifische Oberfläche zu entwickeln, wurden von Carsten Prinz (Gruppe von Dr. F. Emmerling, BAM, Berlin, GER) erweiterte Adsorptionsmessungen an dem fraktionierten  $\text{MgF}_2$ -Xerogel durchgeführt, das für die Adsorption-Elutionsversuche eingesetzt wurde. Es ergab sich eine Isotherme des Tys IV, die die Anwesenheit von Mesoporen nahelegt (Abbildung 37 A).<sup>[141]</sup> Im Gegensatz zum unbehandelten Xerogel wurde für das fraktionierte Pulver eine stark reduzierte BET-Oberfläche von  $(135.1 \pm 0.2) \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  erhalten. Dieser Wert ist nach der Trocknung aus wässriger Suspension nach der Fraktionierung sinnvoll. Messungen bei niedrigeren Drücken und mit längeren Messzeiten wurden durchgeführt, um neben den reinen BET-Auswertungen zusätzlich einen t-Plot nach de Boer zu erhalten.<sup>[167]</sup> Dieser ermöglichte eine Unterscheidung zwischen Mikroporen und externer Oberfläche. Eine Oberfläche von  $131.1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  entfiel auf Mikroporen, während nur  $3.9 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  den Mesoporen oder größeren Zwischenräumen zuzuschreiben waren. Außerdem konnte aus der Auftragung nach Porenweiten in Abbildung 37 B der Anteil der Poren abgeschätzt werden, der realistisch für Konjugate in Lösung zugänglich ist (grau schraffiert). Dafür wurde der

hydrodynamische Durchmesser  $D_h$  eines MBC-Konjugats zu 1.61 nm berechnet und für die Kalkulation der Oberfläche nur der Anteil berücksichtigt, bei dem der Porendurchmesser mindestens  $D_h(\text{MBC})$  entsprach (Berechnung im Experimentaltail, Kapitel 5.2). Aus dieser reduzierten BET-Oberfläche von  $124.2 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$  resultiert eine angenäherte Oberflächenbelegung von 23% der verfügbaren  $\text{MgF}_2$ -Oberfläche (Abbildung 37 C, Berechnung im Experimentaltail, Kapitel 5.2).



**Abbildung 37:** Resultate der Stickstoff-Adsorption/Desorption an fraktioniertem  $\text{MgF}_2$ -Xerogel aus den Adsorption-Elutionstests: (A) BET-Isotherme des Typs IV lässt auf Mesoporen schließen. (B) Spezifische Oberfläche in Abhängigkeit der Porendurchmesser lässt die Abschätzung der Oberfläche zu, die tatsächlich für Konjugate in Lösung zugänglich ist (grau schraffiert, Grenzporerweite entspricht  $D_h$  von MBC). (C) Ergebnisse der Berechnung der Oberflächenbelegung von fraktioniertem  $\text{MgF}_2$  mit MBC.

Dieser korrigierte Wert ist nach kritischer Betrachtung realistischer als die Berechnungen, die auf der SEM- bzw. der unkorrigierten BET-Oberfläche basieren. Die Plausibilität der Resultate wird von den Ausgleichsfunktionen der Langmuir-Isothermen unterstützt (Abbildung 34). Die stabile Beschichtungsmenge von  $24 \mu\text{mol MBC g}^{-1} \text{ MgF}_2$  ( $0.5 \text{ mM}$ ) entspricht 39% der maximalen Haftmenge  $\theta_{\text{max}}$  einer theoretischen Monolage. Dieser Wert liegt in der gleichen Größenordnung wie die hier berechnete Belegung  $\theta$  von 23%.

### 3.1.1.9 Teilzusammenfassung

Die Adhäsion von Peptiden und Peptid-Polymer-Konjugaten ist ein komplexer Prozess. Viele Parameter lassen sich jedoch nicht auf verschiedene Substrate verallgemeinern. Aus diesem Grund ist das Phagen-Display als kombinatorische Methode, die selbst lokale Bereiche inklusive Unregelmäßigkeiten der anorganischen Oberflächen auslesen kann, äußerst nützlich zur Identifizierung neuer materialspezifischer Partikelstabilisatoren. Im Fall der hochgestörten  $\text{MgF}_2$ -Partikel konnten mit diesem Ansatz sequenzspezifische Peptid-Binder mit hoher Materialaffinität identifiziert werden, die auch als Peptid-PEG-Konjugate nachweislich stabile Beschichtungen auf  $\text{MgF}_2$ -Oberflächen in Lösung ausbilden. Aus den Adsorption-Elutionsexperimenten ging hervor, dass die Beschichtung mit Peptid-PEG-Konjugaten die Ausbildung von Mehrfachschichten weitgehend unterbindet. Die selbstorganisierte Adhäsion stellt eine einfache Methode zur nicht-kovalenten, dennoch stabilen Funktionalisierung von Oberflächen dar. Bindungsstudien mit strukturell variierten Peptid-Sequenzen und veränderten Inkubationsparametern erweiterten das Verständnis der beteiligten Wechselwirkungen. Die Haftung der Hydroxid-reichen MBP-Sequenz ist auf wichtige Lewis-Säure/Base-Wechselwirkungen zurückzuführen. Neben den Einzelfunktionalitäten erwies sich die Position der Aminosäuren als ein wichtiger Einflussfaktor, sodass sich der *N*-terminale Teil des Peptids als aktive Bindungsdomäne herausstellte. Vergleichende Experimente mit MBC und  $\text{MBC}^{\text{SC}}$  offenbarten, dass nicht die Bindungsstärke der Konjugate zum Substrat ausschlaggebend für die Adhäsionseigenschaften ist. Eventuell spielt hier die Reversibilität der Bindung bzw. das Verhältnis zwischen Adsorption und Desorption eine Rolle. Letzteres ist allerdings sehr schwierig analytisch zu bestätigen. Die Untersuchung der Struktur-Eigenschaftsbeziehung der Konjugate verdeutlichte, dass deren räumliche Ausdehnung bzw. die Fläche, die sie auf der Oberfläche einnehmen, den größten Einfluss auf die irreversiblen Adsorptionsmengen hat. Damit sind größere PEG-Blöcke für eine effektive Beschichtung grundsätzlich vielversprechend. Außerdem konkurriert die Bindung zur anorganischen Oberfläche immer mit intermolekularen Wechselwirkungen, weshalb wiederholte Peptid-Motive mit Tendenz zur Aggregation wenig effizient sind. Strukturell eingeschränkte, zyklische Peptide oder noch kürzere Peptide, die auf eine reine Bindungsdomäne reduziert sind, sind aus praktischen und ökonomischen Gründen hingegen vielversprechende Spezies für zukünftige Forschungsarbeiten.

### 3.1.2 Größenstabilisierung von $\text{MgF}_2$ -Nanopartikeln<sup>[139]</sup>

Nach der detaillierten Untersuchung der Adhäsionseigenschaften der peptidbasierten Konjugate stellt die Anwendung der sequenzspezifischen Adsorption auf  $\text{MgF}_2$ -Oberflächen den nächsten Schritt dar. Innerhalb der letzten Jahrzehnte entwickelten sich die Sol-Gel-Synthese zu einer der leistungsstärksten Strategien zur Herstellung von Nanopartikeln und nanostrukturierten Materialien.<sup>[168]</sup> Eine Vielfalt an Materialien kann auf diesem Weg dargestellt werden.<sup>[169]</sup> Für die Herstellung von Metalloxiden gibt es bereits ein breites Spektrum an Synthesen, mit deren Hilfe die Parameter wie Zusammensetzung, Größe, Form und Architektur definiert eingestellt werden können. Die Syntheseansätze reichen dabei von wenigen Gramm im Labormaßstab bis zum Multitonnenmaßstab für die industrielle Anwendung.<sup>[1b, 170]</sup> Auf dem Gebiet der Metallfluoride hingegen ist die Entwicklung weniger weit fortgeschritten, obwohl diese durch ihre herausragenden optischen Eigenschaften den oxidischen Analoga in einigen Anwendungen überlegen sind. So decken sie einen weiteren Bereich von Brechungsindices ab und zeigen eine häufig bessere Transparenz für IR- und UV-Strahlung.<sup>[171]</sup>

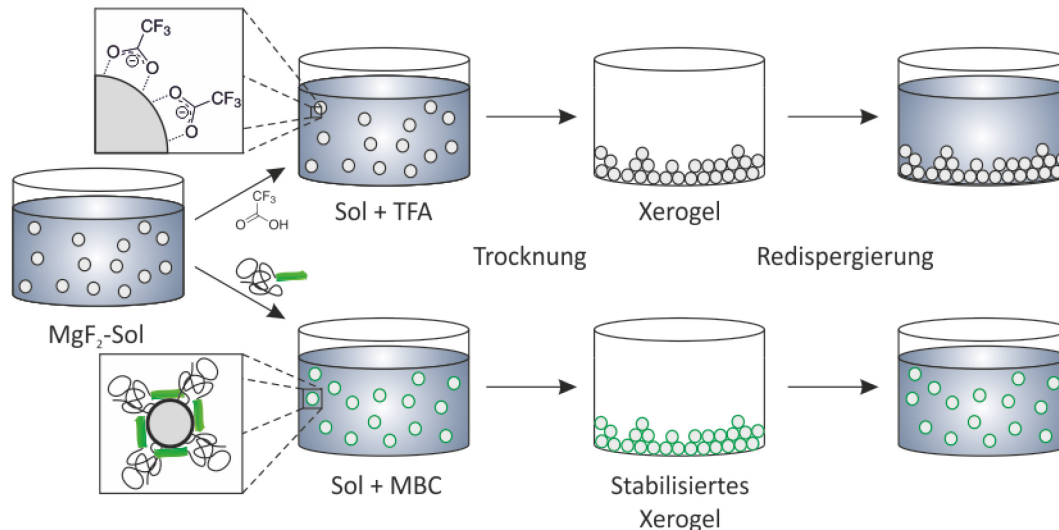
#### 3.1.2.1 Konzept zur Nanopartikelstabilisierung

Nanopartikel sind viel genutzte Grundbausteine für die Selbstorganisation von hierarchischen Verbundwerkstoffen und bioinspirierten Materialien.<sup>[172]</sup> Außerdem weisen sie häufig biologisch relevante Eigenschaften für die Biomedizin auf.<sup>[173]</sup> Im Sol-Gel-Verfahren bestimmt die Auswahl des Ausgangsstoffes (engl. *precursor*) und der Reaktionsbedingungen die grundlegende Chemie. Auch die zusätzliche Beigabe von funktionalen Additiven kann Partikelwachstumsprozesse kontrollieren, Koagulationen vermeiden oder Oberflächen in wenigen Schritten modifizieren. Ein tiefgreifendes Verständnis dieser Prozesse ermöglicht die wissensbasierte Selektion und Herstellung von Sol-Gel-Additiven. Traditionell kommen dabei oft empirische Ansätze zum Einsatz.<sup>[116]</sup> Es gibt nur wenige Studien, die auf die kombinatorische Erschließung stabilisierender Additive setzen, welche zu ganz neuen Klassen von Stabilisatoren führen.<sup>[118, 174]</sup> Somit bleiben bisher große Bibliotheken, die zwischen  $10^6$  und  $10^{15}$  verschiedene Spezies gleichzeitig zur kombinatorischen Selbstselektion anbieten, und deren Potenzial in der Suche nach Sol- und Nanopartikel-Stabilisatoren ungenutzt. Das

Phagen-Display eignet sich zu diesem Zweck, weil es in der Lage ist, Anorganik-bindende Peptide leicht zu identifizieren. Über diese Peptide ist bekannt, dass sie durch Oberflächenadhäsion das Kristallwachstum biomedizinisch relevanter Materialien steuern können.<sup>[124, 175]</sup> Dieses materialspezifische Bindungsverhalten sollte sich auch auf die Stabilisierung von Partikeldispersionen anwenden lassen.

### 3.1.2.2 Nanopartikelstabilisierung und -redispersierung

Im Folgenden wird das  $\text{MgF}_2$ -bindende PEG-Biokonjugat MBC, das seine Materialaffinität unter wässrigen und methanolischen Bedingungen bestätigen konnte, auf seine Eignung als maßgeschneiderter Sol-Stabilisator untersucht (Abbildung 38). Verschiedene Äquivalente von MBC wurden dem  $\text{MgF}_2$ -Sol zugegeben und deren Effekt auf die Stabilität beim Eintrocknen des Sols im Vergleich mit unbehandeltem Sol und mit dem etablierten Stabilisator Trifluoressigsäure (TFA) getestet. TFA diente als Referenzadditiv, das zur Stabilisierung von Metallfluorid-Solen geeignet ist und für stark beschleunigte Deagglomeration und geringere Aufklarungszeiten sorgt.<sup>[85c, 93a, 176]</sup>



**Abbildung 38:** Konzept der Sol-Nanopartikelstabilisierung durch Zugabe des etablierten  $\text{MgF}_2$ -Stabilisators TFA (oben) und des neuartigen Stabilisators MBC (unten). Die Stabilisierung der  $\text{MgF}_2$ -Sol-Nanopartikel nach der Trocknung und Redispergierung konnten nur von MBC gewährleistet werden.

Über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 0.25 bis 8.00 mol% (Menge MBC bezogen auf stöchiometrische Mengen  $\text{MgF}_2$ ) wurden keine störenden Einflüsse von MBC auf die  $\text{MgF}_2$ -Sol-Synthese festgestellt. In allen Fällen klärten die Sol-Proben innerhalb von ca. 2-3 Wochen optisch auf. Damit benötigten sie genauso lange wie nicht-stabilisierte Sole ohne Zusätze, womit ein nachteiliger Einfluss des Konjugats auf die

Alterung ausgeschlossen werden konnte.<sup>[177]</sup> Um allerdings die Effektivität des Konjugats zur Stabilisierung der Sole beurteilen zu können, wurden die Proben nach Zugabe der potentiellen Stabilisatoren und der optischen Aufklärung unter vermindertem Druck vollständig getrocknet. Anschließend erfolgte die Redispergierung in Methanol durch Schütteln und eine 10-minütige Ultraschallbad-Behandlung. Daraufhin wurden die Proben auf optische Transparenz und die Anwesenheit von Nanopartikeln untersucht. Letzteres geschah mit Hilfe von DLS-,  $^{19}\text{F}$ -Flüssig-NMR- und Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)-Messungen sowie durch einfache, optische Lichtstreuversuche sowohl vor als auch nach dem Trocknungsprozess. Die Ergebnisse aller Methoden sind in Tabelle 1 zusammengefasst.  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektren der Sole konnten die Bildung von  $\text{MgF}_2$ -Sol-Nanopartikeln durch deren charakteristisches Signal bei  $\delta(^{19}\text{F}) = -198$  ppm mit großen Linienbreiten  $> 500$  Hz bestätigen.<sup>[177]</sup>

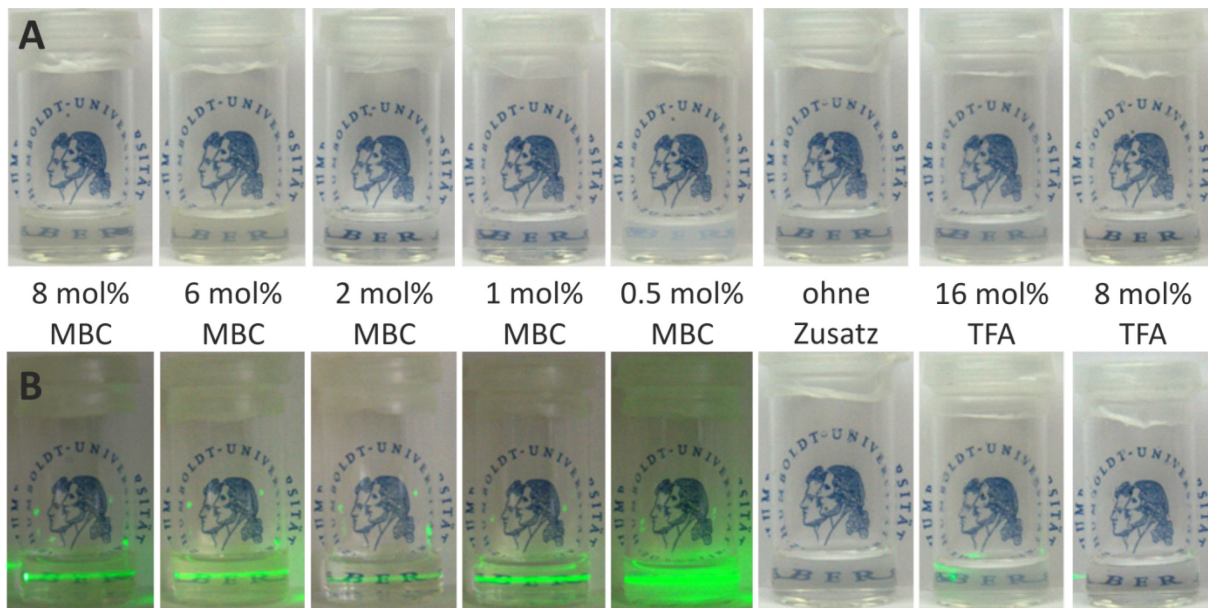
**Tabelle 1:** Ergebnisse der Stabilisierungsexperimente nach Zugabe von verschiedenen Mengen an MBC, TFA sowie ohne Zusätze: Angegeben sind Partikelgrößenmaxima  $D_{h,\text{max}}$  vor und nach Trocknung und Redispergierung in Methanol sowie weitere Stabilisierungsergebnisse.

Stabilisator	Menge [mol%] <sup>a</sup>	vor Trocknung		nach Trocknung		
		$D_{h,\text{max}}$ (DLS) [nm] <sup>b</sup>	$D_{h,\text{max}}$ (DLS) [nm] <sup>b</sup>	Sol-Signal ( $^{19}\text{F}$ -NMR) <sup>c</sup>	Tyndall- Effekt <sup>d</sup>	Optik der Xerogele nach Redispergierung
MBC	8	23	14	ja	ja	optisch klar
MBC	6	10	14	ja	ja	optisch klar
MBC	2	2	3	ja	ja	optisch klar
MBC	1	6	2	ja	ja	optisch klar
MBC	0.5	10	5	ja	ja	trüb, aber stabil
MBC	0.45	9	232	ja	ja	trüb, Sedimentation <sup>e</sup>
MBC	0.4	12	158	ja	ja	trüb, Sedimentation <sup>e</sup>
MBC	0.35	10	184	ja	ja	trüb, Sedimentation <sup>e</sup>
MBC	0.3	12	181	ja	ja	trüb, Sedimentation <sup>e</sup>
MBC	0.25	10	160	ja	ja	trüb, Sedimentation <sup>e</sup>
ohne	-	9	190	nein	nein	schnelle Sedimentation
TFA	16	2	80	nein	nein	schnelle Sedimentation
TFA	8	2	133	nein	nein	schnelle Sedimentation

(a) mol% bezogen auf  $n(\text{MgF}_2)$ , (b) hydrodynamische Durchmesser im Maximum der volumengewichteten Größenverteilung  $D_{h,\text{max}}$  nach Filtration ( $0.45\ \mu\text{m}$ ), (c) charakteristisches  $\text{MgF}_2$ -Sol-Signal bei  $\delta(^{19}\text{F}) = -198$  ppm, (d) Sichtbarkeit von Streueffekten bei Transmission von Laserlicht, © Sedimentation über Nacht

Die DLS-Größenverteilungen der Sole vor der Trocknung zeigten Partikelgrößenmaxima zwischen 2 nm und 23 nm. Dabei gab es keine Anzeichen für größere Agglomerate. Damit rangierten die Werte im Rahmen der üblichen Durchmesser für stark TFA-stabilisierte Suspensionen (8-16 mol% TFA). Bei der Verwendung von 16 mol% TFA klarte das Sol zügig innerhalb von 30 min auf. Dieses Verhalten war für die MBC-stabilisierten Sole nicht zu beobachten.





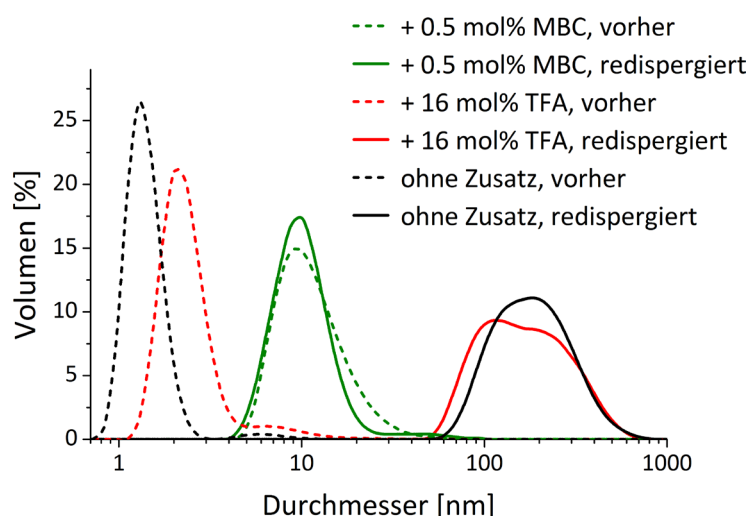
**Abbildung 39:** Photographien der  $\text{MgF}_2$ -Dispersionen in Methanol mit unterschiedlichen Additiven nach der Redispergierung: (A) und (B) zeigt jeweils dieselben Proben, die bei (B) von einem Laserstrahl durchstrahlt wurden. Durch die Streuung an nicht sedimentierenden Partikeln (Tyndall-Effekt), lässt sich zwischen klaren Suspensionen (effektiv stabilisierte Nanopartikel) und reinen Lösungen (sedimentierte Koagulate) unterscheiden.

Bei der Konjugat-Stabilisierung mit MBC wurde im Gegensatz zu der TFA-Stabilisierung eine komplette Redispergierung zu optisch klaren Suspensionen erreicht. Außerdem konnte eine eindeutige Konzentrationsabhängigkeit der Stabilisierungseffektivität beobachtet werden. Die Zugabe von 1-8 mol% MBC führte zu Proben, die wieder komplett zur optischen Transparenz ohne sichtbare Agglomerate redispergiert werden konnten. Diese erfolgreich Konjugat-stabilisierten Proben zeigten auch über Tage und Wochen keine Sedimentation. Damit präsentierten sie ein entscheidend besseres Verhalten als die TFA- und die nicht-stabilisierte Sole (Tabelle 1). Eine Konzentration von 0.5 mol% MBC stellte einen kritischen Wert dar. Das entsprechende, redispergierte Xerogel war eine stabile, kolloidale Suspension, die allerdings leicht trüb war (Abbildung 39 A). Insgesamt waren mit bloßem Auge bereits klare Unterschiede zwischen den unterschiedlich stabilisierten Proben erkennbar. Alle Proben wurden auf die Anwesenheit von Nano- und Submikropartikeln getestet, indem sie mit einem Laser durchstrahlt wurden (Abbildung 39 B). Nur wenn Partikel mit Durchmessern im Bereich der Wellenlänge des eingestrahlt Lichts (ca. 530 nm) in der Probe im Methanol dispergiert waren, kam es zur Streuung des Laserstrahls (Tyndall-Effekt). Auf diese Weise konnte zwischen redispergierten Nanopartikeln und reinen Lösungen unterschieden werden. Bei den Proben ohne Streueffekt, denen TFA oder kein weiterer



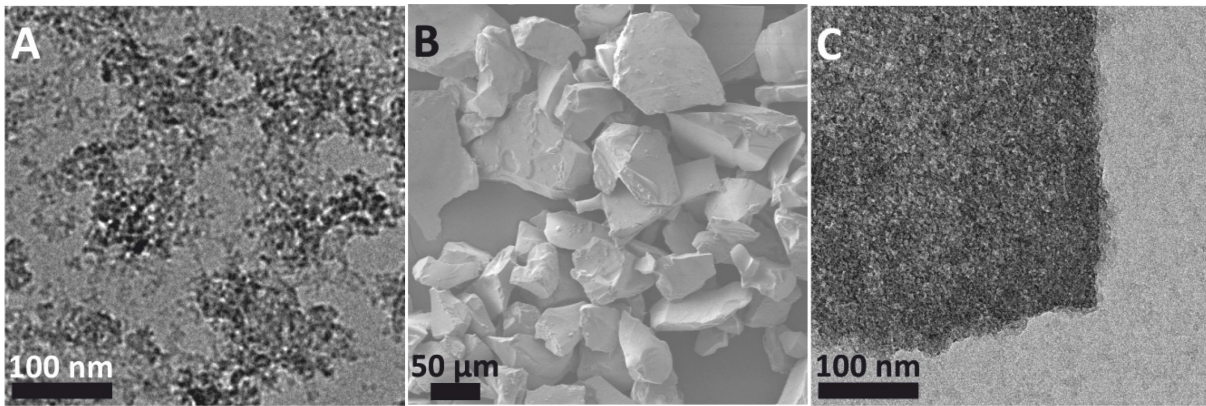
Zusatz zugegeben wurde, fanden sich am Boden sedimentierte Aggregate, die auch mit intensiver Ultraschallbehandlung nicht mehr separiert werden konnten.

Diese optischen Beobachtungen wurden durch Vorher-Nachher-Vergleiche mittels DLS-Größenverteilungen der  $\text{MgF}_2$ -Partikel unterstützt. Die Messungen zeigten unveränderte Verteilungsmaxima mit  $D_{h,\text{max}} = 10$  nm vor und nach der Redispergierung, wenn mindestens 0.5 mol% MBC als Stabilisator hinzugefügt wurde (Abbildung 40). Im Gegensatz dazu stiegen die hydrodynamischen Partikeldurchmesser drastisch von 2 nm auf 80 nm bis 130 nm an, wenn TFA bzw. kein Zusatz verwendet wurde. In letzteren Xerogel-Suspensionen wuchsen die Agglomerat-Größen bis zu 800 nm. Partikel dieser Größen eignen sich nicht mehr als stabile Kolloide in Methanol.



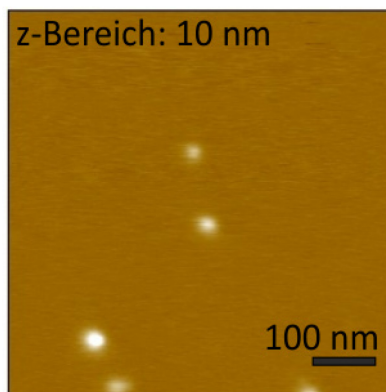
**Abbildung 40:** DLS-Größenverteilungen der hydrodynamischen Durchmesser vor und nach Trocknung und Redispergierung: Nur MBC-stabilisierte Sole zeigten nahezu deckungsgleiche Verteilungen im Vorher-Nachher-Vergleich, während TFA- und nicht-stabilisierte Sole klare Agglomeratbildung aufwiesen (Bedingungen: filtriert durch 0.45  $\mu\text{m}$  Nylon-Spritzenfilter).

Einzig das speziell für  $\text{MgF}_2$  selektierte Konjugat MBC konnte den nanoskopischen Charakter des  $\text{MgF}_2$ -Sols aufrechterhalten. Das MBC belegt über die peptidischen Wechselwirkungen die hochenergetischen Nanopartikel-Oberflächen. Der PEG-Block sorgt für eine sterische Stabilisierung und verhindert sehr effektiv die irreversible Agglomeration der Sol-Partikel. Diese Erkenntnisse wurden durch mikroskopische Analysen der redispergierten Proben unterstützt (Abbildung 41 & Anhang, Abbildung A2 im Detail). In den TEM-Aufnahmen von MBC-stabilisiertem  $\text{MgF}_2$  sind locker gepackte Netzwerke aus Sol-Partikeln zu erkennen (Abbildung 41 A). Diese Agglomeration war reversibel wie bereits durch andere Methoden bestätigt wurde. Außerdem wurden auf größeren Skalen im SEM keine größeren Partikel gefunden (Anhang, Abbildung A2 A).



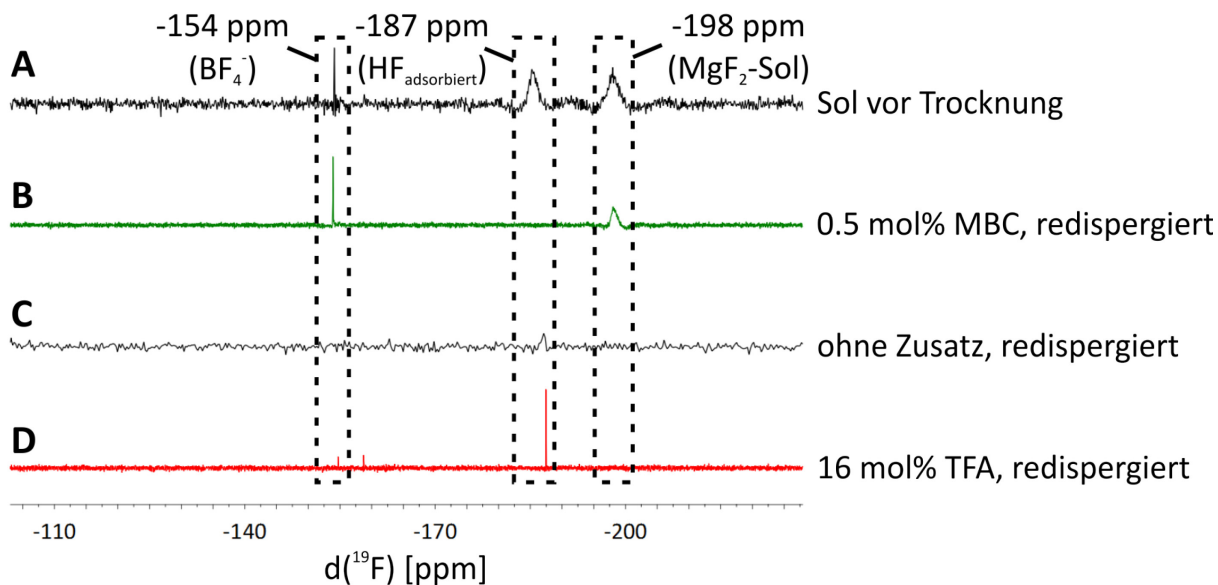
**Abbildung 41:** Mikroskopie-Aufnahmen der redispergierten Xerogele: (A) TEM-Aufnahme des MBC-stabilisierten  $\text{MgF}_2$ , (B) SEM-Aufnahme von TFA-behandeltem  $\text{MgF}_2$ -Agglomeraten und (C) TEM-Aufnahme des nicht-stabilisierten  $\text{MgF}_2$  (Bedingungen: Zugabe von (A) 0.5 mol% MBC, (B) 16 mol% TFA).

Die Redispergierung von nicht- und TFA-stabilisierten Xerogelen führte zu SEM- und TEM-Aufnahmen von irreversibel agglomerierten Partikeln in den Größenordnungen von Mikrometern mit kompakter innerer Struktur (Abbildung 41 B & C). Weitere TEM-Kontrollexperimente mit reinem PEG als Additiv bestätigten, dass der Einfluss des PEGs auf die  $\text{MgF}_2$ -Stabilisierung vernachlässigt werden kann. So ergaben sich bei der Zugabe von  $\alpha$ -Methoxy-PEG ( $M_n = 2000 \text{ g mol}^{-1}$ ) keine stabilisierenden Eigenschaften wie sie für MBC festgestellt wurden. Es wurde mikroskopisch kein Unterschied zu Proben ohne Stabilisator festgestellt (Anhang, Abbildung A2 C).



**Abbildung 42:** Isolierte MBC-stabilisierte  $\text{MgF}_2$ -Nanopartikel nach Redispergierung: AFM-Aufnahme des mit 0.5 mol% MBC stabilisierten Xerogels zeigt isolierte Partikel.

Zusätzlich wiesen AFM-Messungen nach, dass die Verbindungen zwischen den Partikeln in Abbildung 42 lediglich Artefakte der Trocknung bei der TEM-Probenvorbereitung waren. Die Aufnahme zeigt isoliert vorliegende Nanopartikel. Die Größenordnung der apparenten Partikeldurchmesser korreliert mit den Größenbestimmungen der DLS-Messungen.



**Abbildung 43:**  $^{19}\text{F}$ -Flüssig-NMR-Spektren zur Bestätigung der An- oder Abwesenheit von Sol-Nanopartikeln: (A)  $\text{MgF}_2$ -Sol vor der Trocknung. Spektren jeweils nach Redispergierung: (B)  $\text{MgF}_2$  stabilisiert mit 0.5 mol% MBC, (C)  $\text{MgF}_2$  ohne Zusätze, (D)  $\text{MgF}_2$  mit Zugabe von 16 mol% TFA.

Durch die Messung der redispergierten Xerogele in Methanol mittels  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie konnte bis zu einer minimalen Konzentration von 0.5 mol% MBC ein weiterer Nachweis für die Erhaltung von Nanopartikeln erbracht werden (Abbildung 43). Hierzu wurde auf die Anwesenheit des  $\text{MgF}_2$ -Signals bei -198 ppm geprüft. Auch die Signalbreite von über 1000 Hz, die charakteristisch für nanoskopische  $\text{MgF}_2$ -Festkörper in der Flüssig-NMR-Spektroskopie ist, konnte im Fall erfolgreich stabilisierter Nanopartikel gefunden werden. Im Gegensatz dazu war bei den TFA- und den nicht-stabilisierten Solen nach Redispergierung kein entsprechendes Signal mehr zu beobachten. Dies weist auf die Abwesenheit von Nanopartikeln in diesen Proben hin.

### 3.1.2.3 Teilzusammenfassung

Das  $\text{MgF}_2$ -affine Konjugat MBC eignet sich hervorragend als Stabilisator für  $\text{MgF}_2$ -Sol-Nanopartikel. Das biokombinatorische Phagen-Display zeigte das Potential zum genauen Auslesen von chemisch-physikalischen Oberflächencharakteristika. Außerdem wies die im wässrigen Medium selektierte Sequenz auch in Methanol noch ausreichende Bindungseigenschaften auf. Des Weiteren ermöglicht das Phagen-Display die Erschließung von Anorganik-bindenden Peptid-PEG-Konjugaten als Nanopartikel-Stabilisatoren, die die Möglichkeiten von rationalem und erfahrungsbasiertem Design übersteigt. Außerdem konnte die Analyse der ausgewählten Sequenzen neue Einblicke

in die Bindungsparameter bei Oberflächenprozessen liefern. Die materialaffinen Eigenschaften der Peptide einschließlich der sequenzspezifischen Adhäsion der Peptid-PEG-Konjugate sorgten für die Stabilisierung der Nanopartikel in Lösung. Diese basiert auf der sterischen Abschirmung der Nanopartikel durch die Polymer-Blöcke, welche über die nicht-kovalenten Wechselwirkungen der Peptide auf den Oberflächen haften. Die Erkenntnisse der Bindungsstudien aus Kapitel 3.1.1 legen nahe, dass effektive Beschichtungen, wie sie zur Partikelstabilisierung nötig sind, durch eine möglichst hohe Packungsdichte der Konjugate erreicht werden können. Starke Säuren wie TFA sind zwar in der Lage die Deagglomeration während der Sol-Gel-Synthese zu beschleunigen und die Partikelgrößen im Sol bei wenigen Nanometern zu halten. Sobald das Lösungsmittel entfernt wurde, konnte TFA keine ausreichende Stabilisierung mehr gewährleisten. Nur die Zugabe von MBC zum Sol konnte oberhalb einer kritischen Konzentrationsgrenze von 0.5 mol% (bezogen auf  $n(\text{MgF}_2)$ ) auch nach einer Redispersierung die Xerogel-Partikel unterhalb von 50 nm stabilisieren. Das erschließt neue Möglichkeiten bei der Handhabung und der Lagerung von Nanopartikeln. Dabei kann auf den Einsatz hochkorrosiver Säuren verzichtet werden. Anhand dieser Studie konnte das kombinatorische Konzept für die praktische Selektion von neuartigen Stabilisatoren etabliert werden. Dieses lässt sich grundsätzlich auf alle festen Oberflächen und anorganischen Partikelarten übertragen, die unter den wässrigen, milden Bedingungen des Phagen-Displays stabil sind.

### 3.2 Kompatibilisierung in Verbundmaterialien

Die Herstellung von künstlichen Kompositmaterialien für biomedizinische Anwendungen stellt die Wissenschaft auch heute noch vor große Herausforderungen. Bioinspirierte Konzepte, die von natürlichen Biomaterialien abgeleitet sind, sollen dabei helfen diese zu überwinden. Diese sind durch mangelnde Kontrolle über die hierarchische Struktur, die materialinternen Grenzflächen und die biorelevanten Funktionalitäten oft schwer zu realisieren.<sup>[178]</sup> Im *Tissue Engineering* wird versucht, diese natürlichen Ideen auf synthetische Analoga zu übertragen, die den mechanischen Eigenschaften der natürlichen Vorbilder entsprechen und sich als Gewebeersatz in den biologischen Organismus integrieren (Abbildung 44). Die Entwicklung von tragenden Gerüsten zur Heilung von kritischen Knochendefekten gilt als vielversprechende Strategie zur Ablösung von autogenen und allogenen Implantaten, die trotz ihrer Nachteile immer noch als Goldstandard in der Knochenersatztherapie gelten.<sup>[10]</sup>

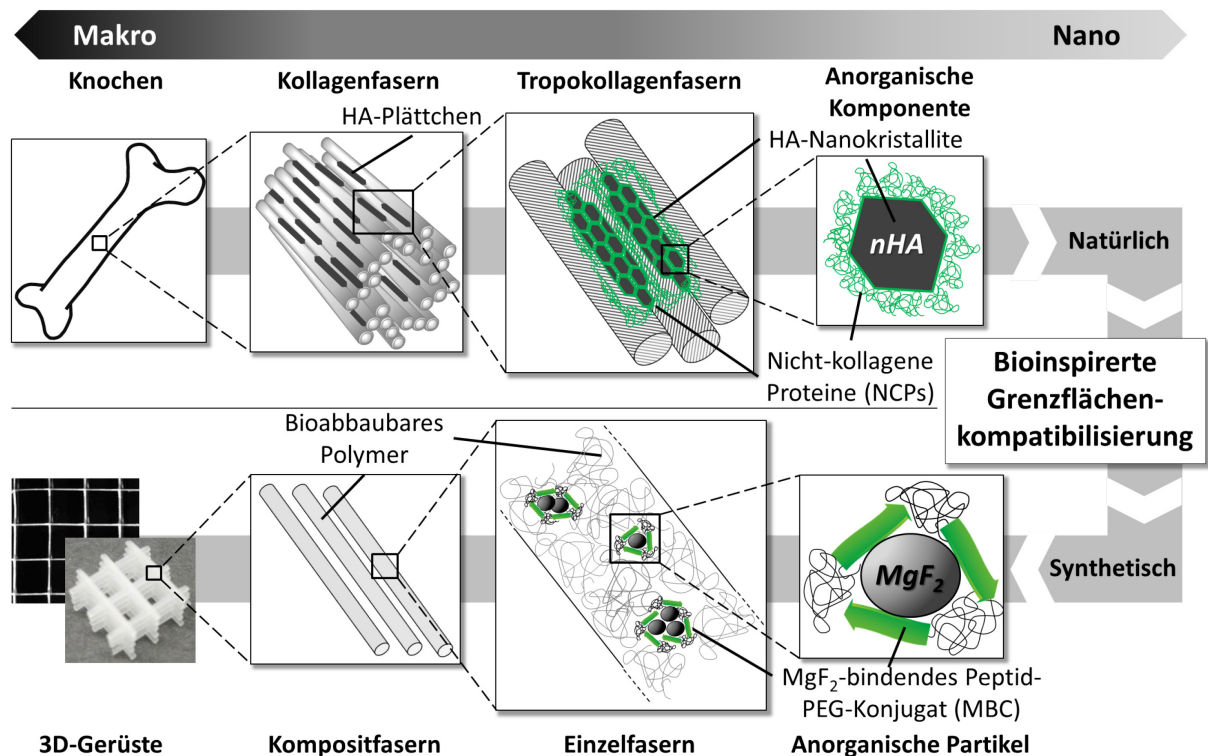


Abbildung 44: Schema der bioinspirierten Kompatibilisierung in organisch-anorganischen Kompositen: Knochen als hierarchisches Biomaterial besitzt durch NCPs stabilisierte Grenzflächen, die eine effektive Verbindung zwischen nHA und der Kollagen-Matrix herstellen (oben). Das Konzept der internen Grenzflächenkompatibilisierung soll auf synthetische Composite aus PCL und MBC-stabilisiertem  $MgF_2$  übertragen werden. Durch die Oberflächenmodifikation mit MBC sollen die  $MgF_2$ -Partikel stabilisiert und effektiv in der Polymer-Matrix verankert werden.

Natürliche Knochen sind wie bereits in Kapitel 2.1 detaillierter beschrieben dynamische Nanokomposite. Durch ihren hierarchischen Aufbau aus harten, aber spröden Hydroxylapatit-Nanokristalliten (nHA), eingebettet in eine weiche, flexible Kollagen-Matrix, weisen sie herausragende, mechanische Eigenschaften auf.<sup>[179]</sup> Besondere Aufmerksamkeit wurde in den letzten Jahren den Grenzflächen innerhalb dieses Biomaterials gewidmet. Mit den nicht-kollagenen Proteinen NCPs wurden Stoffe mit hoher Affinität zu Calcium-reichen Oberflächen identifiziert, die durch ihre kompatibilisierende Wirkung Wechselwirkungen zwischen dem anorganischem nHA und der organischen Kollagen-Matrix vermitteln.<sup>[18, 180]</sup> Diese Grenzflächenstabilisierung ist nachweislich für die effektive Energieverteilung in Knochen und damit für deren feste, dennoch flexible Mechanik verantwortlich. Auf diese Weise kann die Entstehung von Mikrorissen und die Rissausbreitung verhindert werden.<sup>[132-133, 181]</sup>

In dieser Arbeit soll die Funktion der komplexen NCPs durch strukturell einfachere Peptid-Polymer-Konjugate nachgeahmt werden. Solche Biokonjugate sind für diesen Zweck äußerst geeignet, weil sie über die Peptid-Domäne sowohl die materialaffine Bindung der Proteine als auch über den Polymer-Block die Verankerung in der weichen Matrix simulieren können. Dabei sind sie synthetisch in definierter Weise herstellbar und können auf spezielle Anwendungen hin präzise eingestellt werden.



### 3.2.1 3D-Komposite mit mechanischer Verstärkung<sup>[182]</sup>

Additive Herstellungsverfahren wie die Schmelzschichtung (FDM) und das Schmelzelektrospinnen im direkten Schreibmodus (MEW) ermöglichen das Design und die Herstellung von definierten, dreidimensionalen Architekturen aus thermoplastischen Polymeren.<sup>[56a]</sup> Durch die Schmelzextrusion von PCL entstehen beim FDM typischerweise Filamente mit Durchmessern von mehreren hundert Mikrometern.<sup>[183]</sup> Das elektrodynamische MEW hingegen ermöglicht kontrolliert abgelegte Fasern mit Submikrometerdurchmessern. Dieser Bereich ist mit anderen schmelzbasierten Prozessen nur schwierig zu erreichen.<sup>[53]</sup> Dünnere Fasern erhöhen die bioaktive Oberfläche, die für die Zelladhäsion und die osteoblastische Knochenbildung entscheidend ist.<sup>[60]</sup>

Für den 3D-Druck von Kompositen, die sowohl den mechanischen als auch den biologischen Ansprüchen genügen sollen, sind sehr homogene Materialien erforderlich. Die Agglomeration der Füllpartikel muss verhindert werden, während die Füllstoffe gleichmäßig im Polymer verteilt sind. Sonst wären verstopfte Extrusionsdüsen, instabile Polymer-Jets oder elektrische Aufladungserscheinungen die Folge, was einen kontrollierten Druck verhindert.<sup>[53, 184]</sup> Bisher wurde bei Studien mit thermoplastischen Polymeren für *Bone Tissue Engineering*-Anwendungen weitgehend auf den Einsatz von Polymer-Partikel-Kompositen verzichtet, obwohl deren synergetische Eigenschaften extrem vielversprechend sind. Um Schwierigkeiten bei der Prozessierung zu umgehen, werden meistens reine Polymere verarbeitet, die wiederum unzureichende mechanische Eigenschaften aufweisen. Aus diesem Grund soll der bioinspirierte Ansatz der Grenzflächenkompatibilisierung zu mechanisch verstärkten, homogenen Kompositen führen, die sich durch 3D-Druckverfahren verarbeiten lassen und gleichzeitig die Anforderungen an Knochenersatzmaterialien erfüllen.

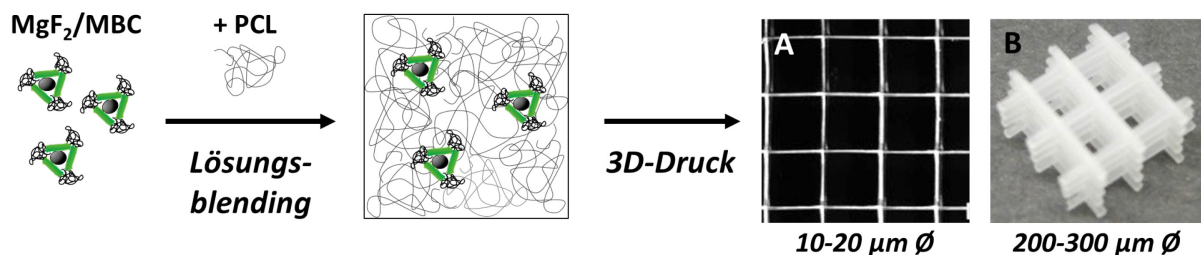


Abbildung 45: Schema der Präparation und Prozessierung von PCL/ $\text{MgF}_2$ -Kompositen mit MBC-stabilisierten Grenzflächen für mechanische Verstärkung: (A) Feinfaserige MEW-Netze (Faserdurchmesser  $\sim 10\text{-}20\text{ }\mu\text{m}$ ) und (B) FDM-Gerüste (Filamentdurchmesser  $\sim 200\text{-}300\text{ }\mu\text{m}$ ).

### 3.2.1.1 Präparation und Charakterisierung der Komposite

In diesem Kapitel werden Komposite aus PCL als Matrixpolymer und  $\text{MgF}_2$ -Nanopartikeln als anorganische Füllstoffe beschrieben (Abbildung 45). Im Allgemeinen erhöhen anorganische Partikel die Steifheit von Polymermaterialien.  $\text{MgF}_2$ -Partikel finden bisher nur wenig Anwendung im *Tissue Engineering*, obwohl sie nicht toxisch sind und durch die Freisetzung von Magnesium- und Fluorid-Ionen weitreichendes Potenzial für biologisch relevante Anwendungen bieten. Diese Ionen fördern nachweislich die Bildung und Aktivität von Osteoblasten bzw. die Vermehrung und Differenzierung von Stammzellen.<sup>[95b, 185]</sup> Fluorid könnte zusätzlich antiseptisch wirken und nötige Mengen an zugesetzten Antibiotika reduzieren.<sup>[95a]</sup> Daher wird das kombinatorisch identifizierte MBC eingesetzt, um die  $\text{MgF}_2$ -Partikel auch in festen Polymermaterialien zu stabilisieren. Es soll als biomimetischer Kompatibilisator wirken, indem es auf den Partikeln adhäriert und deren Oberfläche mit PEG funktionalisiert. Neben der abschirmenden Funktion sollte der PEG-Block zu einer verbesserten Benetzbarkeit der hydrophoben PCL-Komposite beitragen.<sup>[139]</sup>

Dazu wurde das MBC zum klaren Sol hinzugefügt und für 4 h inkubiert. Dieses stabilisierte Sol wurde zu einer Lösung aus PCL ( $M_w = 50$  kDa) gegeben und zu Rohkompositen eingetrocknet. Auf diese Weise wurden Komposite mit unterschiedlichen  $\text{MgF}_2$ -Gehalten von 1, 5, 10 und 15 wt% präpariert. Es wurde sowohl das MBC-kompatibilisierte  $\text{MgF}_2$  (*compatibilized*  $\text{MgF}_2$ , c $\text{MgF}_2$ ) als auch das unmodifizierte, pure  $\text{MgF}_2$  (p $\text{MgF}_2$ ) eingesetzt (Tabelle 2). Ein vorausgehendes Screening der Konjugat-Konzentration ergab ein Optimum von 3 mol% MBC (bezogen auf n( $\text{MgF}_2$ )) in den Kompositen. Bei dieser Konzentration wurde die höchste Materialverstärkung in Zugexperimenten von FDM-gedruckten Filamenten beobachtet (Anhang, Abbildung A3). Daher wurde diese Konzentration auch in den Folgeexperimenten verwendet.

Die Rohkomposite sollten mit Hilfe von 3D-Druckverfahren zu porösen, dreidimensionalen Gerüsten verarbeitet werden, sodass sie sich später für Anwendungen in der Geweberekonstruktion eignen. Dazu wurden sowohl das MEW als auch das FDM ausgewählt. Das MEW wurde gemeinsam mit Gernot Hochleitner (Gruppe von Prof. J. Groll, Lehrstuhl für Funktionswerkstoffe der Medizin und der Zahnheilkunde (FMZ), Universität Würzburg, Würzburg, GER) durchgeführt und vereint die Vorteile vom Lösungselektrospinnen (SES) mit denen additiver



Fertigungsmethoden. Es produziert dünne Fasern (üblicherweise zwischen 10-20  $\mu\text{m}$  Durchmesser), die ohne Lösungsmittelzusatz in definierter Weise Schicht für Schicht 3D-Strukturen aufbauen. Die erreichbaren Durchmesser sind verglichen mit üblichen FDM-Anwendungen damit etwa zehnmal dünner. Dafür ist das MEW wesentlich anfälliger gegen Schwankungen der Viskosität oder der Zusammensetzungen der Schmelze, weil sich ein stabiler Taylor-Kegel und ein kontinuierlicher Polymer-Jet ausbilden müssen. Deswegen wurde der Einfluss des Kompatibilisators auf die Verarbeitbarkeit der PCL/MgF<sub>2</sub>-Komposite zuerst beim MEW untersucht.

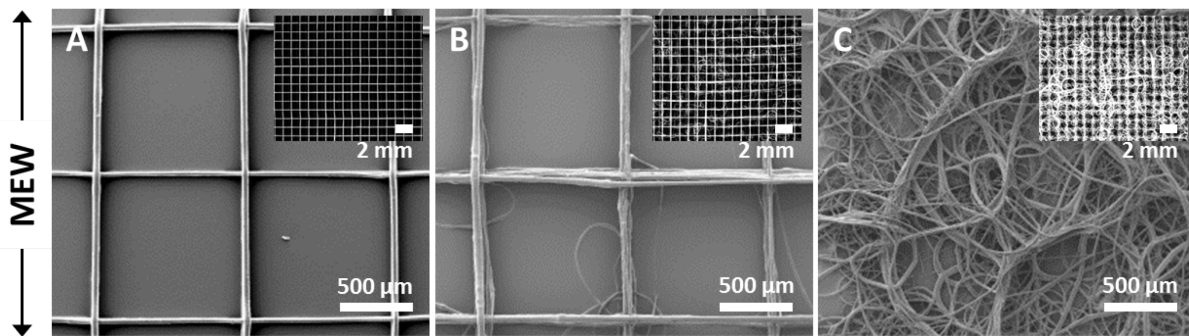
**Tabelle 2: Zusammensetzungen der untersuchten PCL/MgF<sub>2</sub>-Komposite sowie deren Prozessierbarkeiten mit 3D-Druckverfahren, die Porositäten und die Kristallinitätsgrade  $X_c$  der FDM-Gerüste.**

Probe/Zusammensetzung <sup>a</sup>	Prozessierbarkeit <sup>c</sup>		Kristallinitätsgrad $X_c$ (DSC) [%]	Röntgencomputertomographie	
	FDM	MEW		Porosität <sup>e</sup> [%]	$w(\text{MgF}_2)$ <sup>f</sup> [wt%]
PCL	ja	ja	$59.2 \pm 0.9$	80	-
PCL / 1 wt% cMgF <sub>2</sub>	ja	ja	$58 \pm 3$	85	1.6
PCL / 5 wt% cMgF <sub>2</sub>	ja	ja	$54 \pm 2$	78	-
PCL / 10 wt% cMgF <sub>2</sub>	ja	nein	$48 \pm 2$	77	-
PCL / 15 wt% cMgF <sub>2</sub>	ja	nein	$47.9 \pm 0.5$	74	15.8
PCL / 1 wt% pMgF <sub>2</sub>	<sup>d</sup>	ja	$55 \pm 2$	80	0.1
PCL / MBC <sup>b</sup>	ja	-	$42 \pm 4$	-	-

(a) cMgF<sub>2</sub> enthält 3 mol% MBC bezogen auf n(MgF<sub>2</sub>) (Abbildung A3 für Komposite mit variierten MBC-Konzentrationen). (b) PCL/MBC enthält die gleiche Menge MBC wie PCL/1 wt% cMgF<sub>2</sub>. (c) Möglichkeit zum kontinuierlichen 3D-Druck. (d) Drucken war erst nach anfänglichem Verstopfen möglich und Komposit enthielt nur sehr wenig MgF<sub>2</sub> nach dem Drucken. © Porosität der FDM-Gerüste berechnet nach Röntgenmikrocomputertomographie ( $\mu\text{CT}$ ). (f) Massenanteil  $w$  berechnet aus prozentualem Objektvolumen [vol%] nach  $\mu\text{CT}$ .

Abbildung 46 A&B zeigen die MEW-gedruckten Komposite mit 1 wt% und 5 wt% cMgF<sub>2</sub>, die noch zuverlässig im direkten Schreibmodus prozessiert werden konnten. Höhere Konzentrationen führten zu Verstopfungen und Jet-Instabilitäten während der Verarbeitung. Der positive Einfluss des Kompatibilisators wurde deutlich als das Referenzkomposit mit 1 wt% unstabilisiertem pMgF<sub>2</sub> verarbeitet wurde. Diese niedrige Massenkonzentration war bereits die Grenzkonzentration, bei der die pMgF<sub>2</sub>-gefüllten Verbundstoffe überhaupt noch verdruckt werden konnten. Allerdings ist bei 1 wt% pMgF<sub>2</sub> nur eine zufällige, unkontrollierte Ablage der Fasern – ähnlich wie beim SES – zu erkennen (Abbildung 46 C & Anhang, Abbildung A4 im Detail). Diese grenzflächenstabilisierten Komposite waren zum Zeitpunkt der Herstellung die ersten, die im direkten Schreibmodus per MEW zu definierten Mustern mit kontrollierter Porosität verarbeitet werden konnten. Dies war nur möglich, weil die mit MBC kompatibilisierten Partikel in der Schmelze homogen verteilt waren und keine größeren Agglomerate die

Extrusionsdüse verstopften. Somit zeigte sich bereits beim MEW der angestrebte Effekt des Konzepts zur Grenzflächenstabilisierung in festen, polymeren Verbundmaterialien.



**Abbildung 46:** SEM-Aufnahmen der MEW-verarbeiteten PCL/MgF<sub>2</sub>-Komposite mit (A) 1 wt% und (B) 5 wt% cMgF<sub>2</sub> sowie mit (C) 1 wt% pMgF<sub>2</sub>. SEM-Überblicke mit kleinerer Vergrößerung sind in den entsprechenden Bildern eingesetzt.

Im Gegensatz zum empfindlichen MEW-Prozess ist das FDM durch die größeren Düsendurchmesser und die Materialzufuhr mit Hilfe von Schraubenextrudern robuster und toleriert mehr Inhomogenitäten in der Schmelze. Die praktische Umsetzung erfolgte in Zusammenarbeit mit Onur Bas (Gruppe von Prof. D. W. Hutmacher, Institute of Health and Biomedical Innovation (IHBI), Queensland University of Technology (QUT), Brisbane, AUS). Die mittels FDM verarbeiteten Proben sind außerdem leichter handhabbar und eignen sich besser zur Untersuchung des Einflusses des spezifischen Kompatibilisators auf die mechanischen Eigenschaften. Dennoch zeigte sich bei der Verarbeitung mittels FDM erneut der positive Effekt des MBCs. Durch das FDM konnten auch höhere Konzentrationen von bis zu 15 wt% cMgF<sub>2</sub> in PCL erfolgreich durch eine 23G-Kanüle (innerer Durchmesser von 0.34 mm) zu gedruckten Gerüsten verarbeitet werden. Von den nicht-kompatibilisierten Proben mit pMgF<sub>2</sub> konnte nur 1 wt% verdruckt werden. Alle höheren Konzentrationen führten selbst mit wesentlich dickeren Kanülen (bis zu 19G = innerer Durchmesser von 0.69 mm) nicht zu tolerierbaren Druckergebnissen (Abbildung 47 & Anhang,

Tabelle A1).

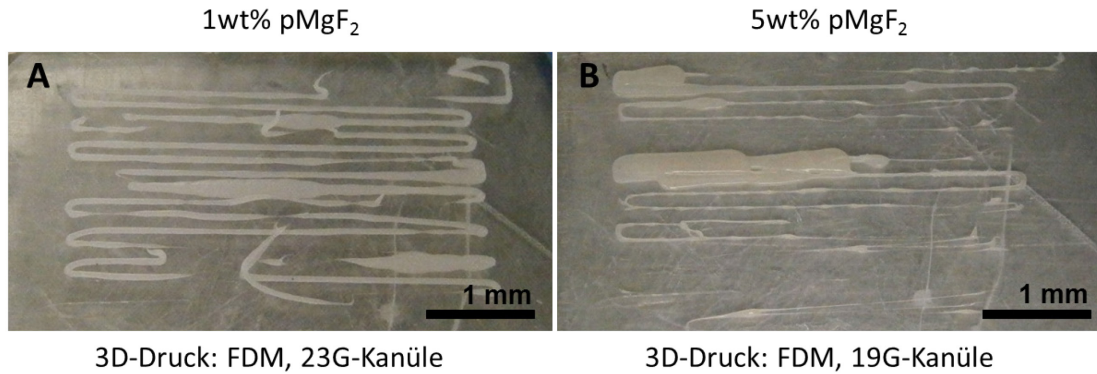


Abbildung 47: Photographien von fehlgeschlagenen FDM-Druckversuchen mit nicht-kompatibilisierten Kompositen mit (A) 1 wt% pMgF<sub>2</sub> und (B) 5 wt% pMgF<sub>2</sub>: Verstopfungen traten für 1 wt% pMgF<sub>2</sub> auf bevor nach einigen Minuten ein kontinuierlicher Druckprozess möglich wurde. Dies begründet den reduzierten Gehalt an MgF<sub>2</sub> im pMgF<sub>2</sub>-Komposit nach dem Druckprozess sein (Abbildung 46 und Tabelle 2).

Abbildung 48 zeigt die SEM-Aufnahmen der Morphologien der schmelzextrudierten Konstrukte und deren Faserquerschnitte. Bei den geringen Füllgraden von 1 wt% ist optisch kein Einfluss des Kompatibilisators auf die Netzwerkstruktur und damit kein Unterschied zu reinem PCL zu erkennen (Abbildung 48 & Anhang, Abbildung A5 im Detail). Bei der Oberflächenbeschaffenheit in der Draufsicht als auch auf den Schnittflächen zeigten die nicht-kompatibilisierten Komposite allerdings größere Rauheiten. Die Referenzmischung PCL/MBC, die nur den Kompatibilisator aber kein MgF<sub>2</sub> enthielt, wies im Vergleich zum reinen PCL ebenfalls keine Unterschiede in der Verarbeitung oder in der Morphologie auf.

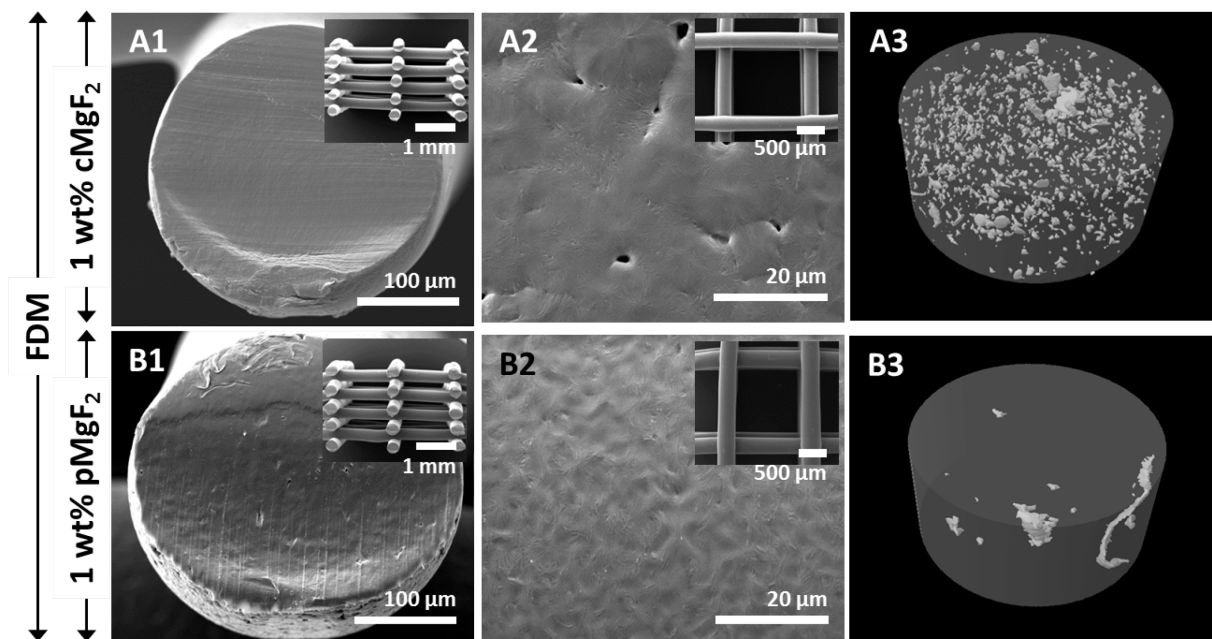
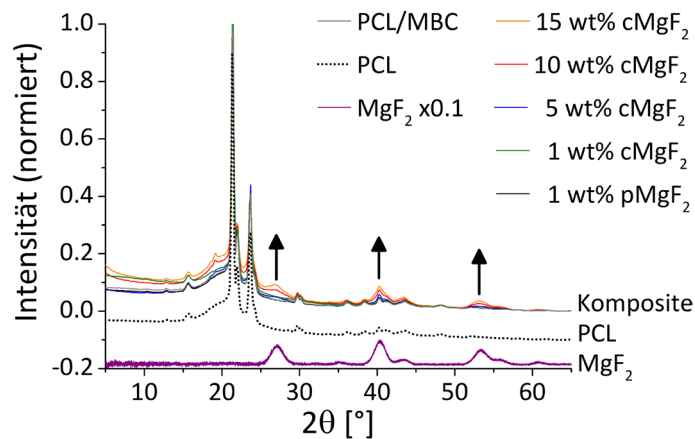


Abbildung 48: FDM-verarbeitete PCL/MgF<sub>2</sub>-Komposite mit (A) 1 wt% cMgF<sub>2</sub> und (B) 1 wt% pMgF<sub>2</sub> im Querschnitt (A1, B1), in der Draufsicht (A2, B2) und als 3D-Rekonstruktion aus µCT-Daten (A3, B3, Filamentschnitte jeweils mit 150 µm Kantenlänge). SEM-Überblicke mit kleinerer Vergrößerung sind in den entsprechenden Bildern eingesetzt.

Nur bei Kompositen mit Füllgraden  $\geq 5$  wt% cMgF<sub>2</sub> konnten mit Hilfe der SEM Agglomerate im Mikrometer- und Submikrometer-Bereich auf der Filamentoberfläche visualisiert werden (Anhang, Abbildung A5). Röntgenmikrocomputertomographie ( $\mu$ CT)- und XRD-Messungen lieferten weitere Einblicke in die kompatibilisierten Komposite. Beide Methoden bestätigten die Anwesenheit von MgF<sub>2</sub> auch nach dem Materialdruck. XRD-Reflexe bei  $2\theta = 27.0^\circ$ ,  $40.4^\circ$  und  $53.4^\circ$  korrespondierten mit den entsprechenden Datenbankeinträgen von MgF<sub>2</sub> (Abbildung 49).



**Abbildung 49:** Diffraktogramme von pMgF<sub>2</sub>-Xerogel (versetzte, violette Linie), PCL und PCL-Kompositen: Die breiten Reflexe bei  $2\theta = 27.1^\circ$ ,  $40.4^\circ$  und  $53.4^\circ$  wurden mit steigenden Füllgraden intensiver (Pfeile).

Des Weiteren ermöglichten die  $\mu$ CT-Scans von Jakub Jaroszewicz (Gruppe von Prof. Swieszkowski, Warsaw University of Technology) die Berechnung der Massenanteile  $w$  von MgF<sub>2</sub> (Abbildung 48 & Tabelle 2). Außerdem wurde die Porosität der Gerüste daraus berechnet. Diese war mit  $(79 \pm 3)\%$  sehr einheitlich bei allen Kompositen. Die hohe Porosität in dieser Größenordnung ist für einen effizienten Zellbewuchs und den Zu- und Abtransport von Sauerstoff, Nährstoffen und metabolischen Abbauprodukten notwendig.<sup>[22]</sup> Die aus den  $\mu$ CT-Scans berechneten Feststoffanteile bestätigten, dass die 3D-Prozessierung die Zusammensetzung der kompatibilisierten Verbundstoffe nicht verändert hat. Sowohl für 1 wt% cMgF<sub>2</sub> als auch für 15 wt% cMgF<sub>2</sub> konnten die Gehalte nach dem FDM von 1.6 wt% bzw. 15.8 wt% im Rahmen der experimentellen Fehler nachgewiesen werden. Vergleiche der 3D-Rekonstruktionen aus den CT-Messungen von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> und 1 wt% pMgF<sub>2</sub> zeigten einen erheblichen Unterschied in der Partikelverteilung (Abbildung 48 A3&B3). Dieser lässt sich auf die Anwesenheit der Kompatibilisatoren zurückführen. Die kompatibilisierte Probe in Abbildung 48 A3 zeigte eine sehr homogene Dispersität der MgF<sub>2</sub>-Partikel in der PCL-Matrix. Beim nicht-kompatibilisierten Komposit hingegen war MgF<sub>2</sub> nur in Form weniger, größer

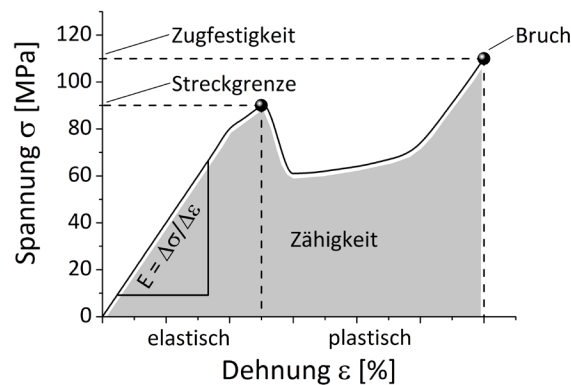
Agglomerate enthalten. Außerdem wurde ein nach dem Drucken stark erniedrigter Anteil von 0.1 wt%  $\text{MgF}_2$  berechnet. Dies war ein klares Zeichen, dass die nicht-stabilisierten Komposite schlechter für die Extrusion geeignet sind. Dieses Verhalten kann auf das diskontinuierliche Druckverhalten innerhalb der ersten ca. 5 min des Druckprozesses zurückgeführt werden (Abbildung 47). Diese Beobachtung deckt sich mit den Ergebnissen aus der Elementaranalyse. Hierbei nahm  $\omega(\text{MgF}_2)$  von  $(1.0 \pm 0.1)$  wt% vor der FDM-Verarbeitung auf  $(0.4 \pm 0.1)$  wt% nach dem Druck ab (Anhang,

Tabelle A1). Im Gegensatz dazu blieb der Gehalt von  $\text{cMgF}_2$  nach der Schmelzextrusion bei  $(1.0 \pm 0.1)$  wt% konstant.

Insgesamt konnte ein positiver Einfluss des Kompatibilisierungsansatzes auf die 3D-Druck-Prozessierbarkeit der PCL/ $\text{MgF}_2$ -Verbundstoffe festgestellt werden. Dieser kann u. a. auf die reduzierte Agglomeration der  $\text{MgF}_2$ -Partikel durch die MBC-Stabilisierung zurückgeführt werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit über die Partikelbeschichtung in Lösung konnten durch parallele Arbeiten von Seidt et al. auch in Kompositen bestätigt werden.<sup>[186]</sup> Dabei wurde mittels Kleinwinkelröntgenstreuung (engl. *small-angle X-ray scattering*, SAXS) an einem PEO/ $\text{MgF}_2$ -Modellsystem nachgewiesen, dass die  $\text{MgF}_2$ -Partikel auch in der Polymer-Matrix weiterhin mit MBC beschichtet sind.<sup>[186b]</sup> Das weist darauf hin, dass die Beschichtung, die bereits in Lösung zur Partikelgrößenstabilisierung führte, auch in Kompositen weiterhin vorhanden ist. Die organische Hülle um die Partikel veränderte die Wechselwirkungen mit dem umgebenden PCL, wodurch die Reibung innerhalb der Schmelze reduziert wurde. Somit konnte die Kompositschmelze gleichmäßig verarbeitet werden. Durch die Kompatibilisierung konnte mit  $\text{MgF}_2$  ein Material für additive Fertigungsverfahren zugänglich gemacht werden, das sich ohne diese Oberflächenmodifikationen nur unzureichend verarbeiten ließ. Diese Strategie sollte sich auch auf andere Partikeltypen übertragen lassen. Dadurch entsteht die Möglichkeit, neue, funktionale Füllmaterialien im 3D-Druck für das *Tissue Engineering* zu etablieren. Außerdem ermöglichen Kombinationen aus FDM und MEW einen weiten Bereich von Faserdurchmessern, durch die gute Kompromisse in Bezug auf mechanische Stabilität und bioaktive Oberfläche erzielt werden können.

### 3.2.1.2 Mechanische Verstärkung

Zur Untersuchung des Einflusses der Kompatibilisierung auf die mechanischen Eigenschaften der Verbundstoffe wurden die FDM-gedruckten Proben auf verschiedenen strukturellen Ebenen untersucht. Es wurden Einzelfilamente in uniaxialen Zugversuchen und die Gerüste in uniaxialen Kompressionsexperimenten getestet. Außerdem wurden einlagige, bündige Schichten gedruckt, die für einige Analyseverfahren (u. a. Indentationsversuche) notwendig waren. Die Zug-, Kompressions- und Indentationsmoduln  $E_{\text{Zug}}$ ,  $E_{\text{Komp}}$  bzw.  $E_{\text{Indent}}$  sowie die Indentationshärten  $H$  wurden aus diesen Messungen abgeleitet.

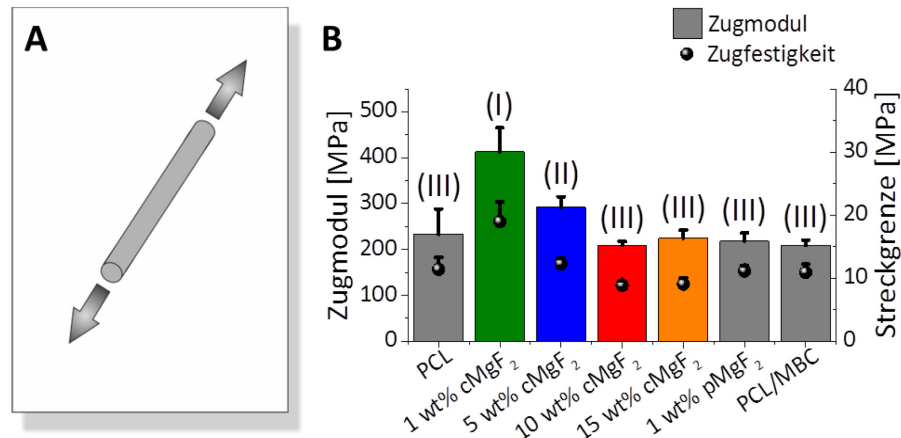


**Abbildung 50:** Ausschnitt einer exemplarischen Spannung-Dehnungskurve von thermoplastischen Polymerwerkstoffen im Zugversuch.

Die Elastizitätsmoduln werden aus der Steigung der Spannung-Dehnungskurve im linear-elastischen Bereich abgeleitet. Sie repräsentieren die Steifigkeit des Materials (Abbildung 50). Am lokalen Maximum, das den elastischen Bereich beschließt, lässt sich die obere Streckgrenze ablesen. Das absolute Maximum der Spannung wird als Zugfestigkeit bezeichnet. Bei typischen PCL-Materialien fällt diese auf Grund der Verfestigung bei der Faserstreckung meist mit dem Materialversagen oder Bruch zusammen. Das Integral unter der Kurve bis zum Bruch ergibt die Zähigkeit eines Werkstoffs. Als Bioersatzmaterialien sind Stoffe ideal, deren mechanische Eigenschaften denen der natürlichen Biomaterialien möglichst genau entsprechen. Das gilt sowohl für die Steifigkeit im linear-elastischen Bereich als auch für die Zähigkeit bei plastischer Verformung. Diese beiden Eigenschaften schließen sich bei synthetischen Materialien häufig aus,<sup>[187]</sup> wobei neue, bioinspirierte Ansätze dies ändern könnten.

Die verschiedenen mechanischen Tests belegten ohne Ausnahme die Verbesserung der mechanischen Eigenschaften durch die Grenzflächenstabilisierung (Abbildung 51). Komposite aus PCL und cMgF<sub>2</sub> zeigten bessere Resultate als reines PCL oder Komposite

mit unmodifiziertem pMgF<sub>2</sub>. Die Präsenz von MBC alleine in PCL konnte durch Versuche mit PCL/MBC-Mischungen als Verstärkungsursache ausgeschlossen werden. In Zugversuchen kam es in den nicht-modifizierten Kompositen (1wt% pMgF<sub>2</sub>) verglichen mit reinem PCL kaum zu veränderten E-Moduln. In kompatibilisierten Proben konnten die Zugmoduln besonders bei niedrigem Füllgrad von 1 wt% erheblich gesteigert werden. Während für pures PCL ein Zugmodul von (233 ± 55) Mpa erhalten wurde, erreichte 1wt% cMgF<sub>2</sub> eine Steigerung um +77% auf (413 ± 52) Mpa.

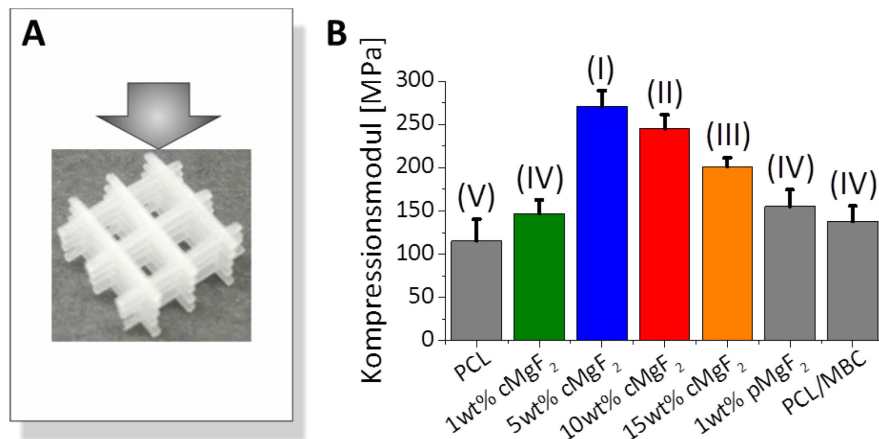


**Abbildung 51: Mechanische Zugversuche: (A) Schematische Veranschaulichung des Versuchsaufbaus. (B) Zugmoduln und obere Streckgrenzen von FDM-verdruckten Kompositen, PCL und PCL/MBC in Form der Einzelfilamente. (Römische Ziffern (I)-(III) klassifizieren die Moduln in Gruppen, die sich jeweils mit einem Signifikanzwert  $p$  von  $p > 0.05$  unterscheiden. Fehlerbalken sind zur besseren Übersichtlichkeit nur halbseitig dargestellt).**

Im Gegensatz dazu vermochte 1 wt% des unmodifizierten pMgF<sub>2</sub> den Zugmodul mit (218 ± 18) Mpa nicht signifikant zu verändern. Dieses Verhalten war nach den  $\mu$ CT-Messungen zu erwarten, da in diesen prozessierten Kompositen kaum noch MgF<sub>2</sub>-Partikel vorhanden waren. Die optimale Füllmenge in den Zugversuchen wurde bereits beim geringen Massenanteil von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> gefunden, was sich mit Beobachtungen aus anderen Nanokompositen deckt. Durch die weitere Erhöhung des cMgF<sub>2</sub>-Gehalts auf 5 wt% ((292 ± 23) Mpa) konnte kein Anstieg des  $E_{\text{Zug}}$  mehr erreicht werden. Höhere Gehalte versteiften das Material noch weniger und erreichten keine nennenswerten Verstärkungen im Vergleich zu reinem PCL. Die verwendete Menge von reinem MBC (~4900 Da) in PCL/MBC (analog zu 1 wt% cMgF<sub>2</sub>) führte nicht zu einer Erweichung der PCL-Matrix ( $M_w = 50$  kDa), wie es von einem niedermolekularen Weichmacher zu erwarten gewesen wäre. Die oberen Streckgrenzen zeigten mit Werten zwischen (19 ± 3) Mpa (1 wt% cMgF<sub>2</sub>) und (9 ± 1) Mpa (sowohl 10 wt% als auch 15 wt% cMgF<sub>2</sub>) einen ähnlichen Trend wie die Zugmoduln. Das entspricht einer 66%igen Verstärkung bei 1 wt% cMgF<sub>2</sub> ausgehend von reinem PCL mit (11 ± 2) Mpa. Die Bedeutung der



Peptid-Sequenz konnte erneut belegt werden, indem Vergleichskomposite getestet wurden, die das Referenzkonjugat MBC<sup>SC</sup> enthielten. Hierfür konnte mit  $E_{\text{Zug}} = (200 \pm 7) \text{ Mpa}$  keine signifikante Verstärkung der Einzelfilamente im Vergleich zu reinem PCL festgestellt werden. Dies verdeutlicht die Bedeutung der sequenzspezifischen Peptid-Domäne auch für die mechanischen Eigenschaften (Anhang, Abbildung A3).



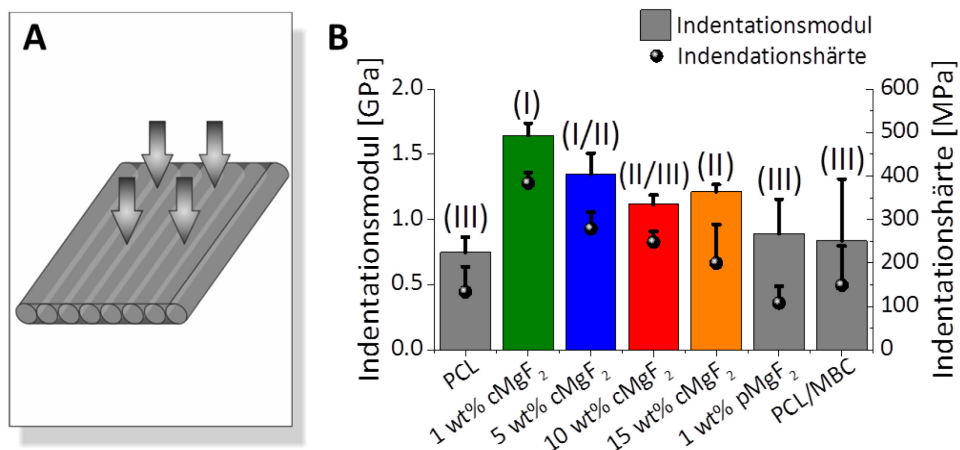
**Abbildung 52: Mechanische Kompressionsversuche: (A) Schematische Veranschaulichung des Versuchsaufbaus. (B) Kompressionsmodul von FDM-gedruckten 3D-Gerüsten (Römische Ziffern (I)-(V) klassifizieren die Moduln in Gruppen, die sich jeweils mit einer Signifikanz von  $p > 0.05$  unterscheiden. Fehlerbalken sind zur besseren Übersichtlichkeit nur halbseitig dargestellt).**

Die gedruckten 3D-Gerüsten verhielten sich in Kompressionsversuchen anders, was sich auf die Netzwerkeffekte der komplexeren Architekturen zurückführen lässt. Die strukturelle Steifheit, die durch die Kompressionsmoduln  $E_{\text{Komp}}$  quantifiziert wird, zeigte mit  $(271 \pm 18) \text{ Mpa}$  das Maximum bei einem Füllgrad von 5 wt% cMgF<sub>2</sub> (Abbildung 52). Das entspricht einer Steigerung um +235% bezogen auf reines PCL mit  $(116 \pm 25) \text{ Mpa}$ . Höhere Massenanteile von 10 wt% und 15 wt% cMgF<sub>2</sub> erhöhten  $E_{\text{Komp}}$  mit  $(245 \pm 16) \text{ Mpa}$  bzw.  $(201 \pm 10) \text{ Mpa}$  ähnlich wie niedrigere Mengen von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> und pMgF<sub>2</sub> nicht noch weiter (beide um 150 Mpa). Die Einflüsse des 3D-Druckprozesses auf die Struktur überlagern an dieser Stelle die verstärkenden Effekte leicht, die bei 1 wt% cMgF<sub>2</sub> in Zugversuchen noch erkennbar waren. Zwei gegenläufige Effekte wirken sich anscheinend bei den Kompressionsexperimenten aus. Einerseits ist die Effektivität der Materialverstärkung bei höheren Massenanteilen durch eine vermehrte Agglomeration und eine dadurch geringere Dispersionsgrad reduziert worden.<sup>[188]</sup> Andererseits wurde die Auflagefläche der verschiedenen Lagen durch das beginnende Durchhängen der Filamente vergrößert, was die Gerüststruktur verdichtete und mechanisch widerstandsfähiger machte. Die Kompressionstests der 3D-Strukturen sind



relevanter für die spätere Anwendung als Knochenimplantate als die Zugversuche der Einzelfilamente. Letztere lassen hingegen mehr Rückschlüsse auf die Verstärkung des eigentlichen Materials zu, weil die beschriebenen Netzwerkeffekte ausgeschlossen werden. Die leicht unterschiedlichen Trends der Tests an den Einzelfilamenten bzw. den 3D-Gerüsten veranschaulicht die Notwendigkeit von komplementären Versuchsaufbauten für eine ausführliche Charakterisierung eines neuen Materials.

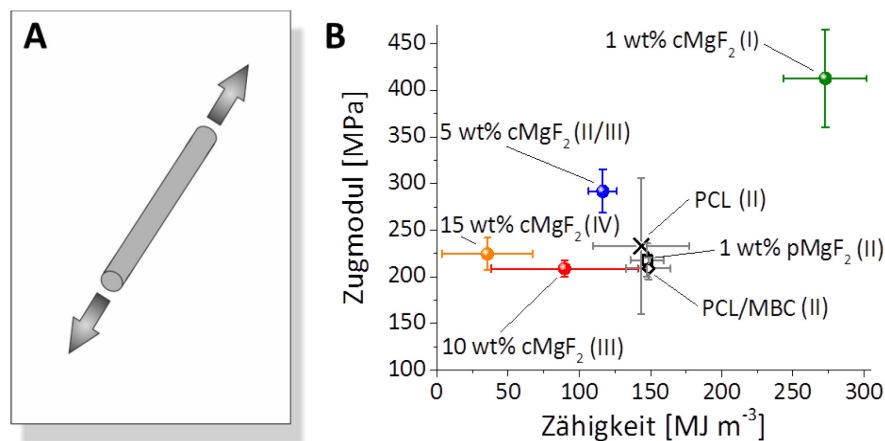
Die Indentationsversuche wurden auf Einzelschichten gedruckt aus parallel angeordneten, bündig gepackten Filamenten durchgeführt. Dabei wurden die Abstände der Filamentstränge so gewählt, dass auf der Unterseite der Schicht eine ebene Fläche entstand. Diese geschlossene Fläche war nötig, damit die Indentationsversuche nicht durch die runde Filamentoberfläche gestört wurden. Die Einzelschichten sind ähnlich unabhängig von Netzwerkeinflüssen wie die Einzelfilamente. So konnten die punktuellen Untersuchungen mit einer Indenterspitze von 5  $\mu\text{m}$  Durchmesser Einblicke in die Homogenität des Materials auf Mikrometerebene liefern. Ein ähnlicher Trend wie bei den Zugmoduln konnte durch die Messungen bestätigt werden. Das Maximum der Indentationsmoduln  $E_{\text{Indent}}$  wurde mit  $(1.65 \pm 0.09)$  GPa bei 1 wt% cMgF<sub>2</sub> festgestellt (Abbildung 53). Dies entspricht einer Steigerung von +120% im Vergleich zum PCL Ausgangsmaterial und +85% bezogen auf das nicht-kompatibilisierte 1 wt% pMgF<sub>2</sub>. Die Indentationshärten verhielten sich analog, wobei die Härte von PCL durch Zusatz von 1wt% cMgF<sub>2</sub> von  $(134 \pm 58)$  Mpa auf  $(384 \pm 25)$  Mpa gesteigert werden konnte. Bei höheren Füllgraden sanken die Werte für  $E_{\text{Indent}}$  und H wieder, womit sie die Ergebnisse der anderen mechanischen Methoden bestätigten. Die moderaten Fehlerbalken in der Größenordnung des homogenen PCLs zeigten, dass die Komposite eine hohe Homogenität aufwiesen.



**Abbildung 53: Mechanische Indentationsversuche: (A) Schematische Veranschaulichung des Versuchsaufbaus. (B) Indentationsmoduln und Indentationshärten von FDM-gedruckten Einzelschichten aus**

bündig verschmolzenen Filamenten (Römische Ziffern (I)-(III) klassifizieren die Moduln in Gruppen, die sich jeweils mit einer Signifikanz von  $p > 0.05$  unterscheiden. Fehlerbalken sind zur besseren Übersichtlichkeit nur halbseitig dargestellt).

Während die Elastizitätsmoduln nur die Steifigkeit eines Materials im linear-elastischen Bereich charakterisieren, ist die Zähigkeit eine Größe, die Aufschluss über Eigenschaften im plastischen Bereich gibt. Der Vorteil von natürlichen Materialien liegt nicht nur in ihrer Steifigkeit oder Härte, sondern sie zeichnen sich oft auch durch eine hohe Zähigkeit aus. Diese macht hochbeanspruchte Knochen äußerst widerstandsfähig gegen äußere Belastungen. Die Zähigkeit wird in synthetischen Biomaterialien selten gemeinsam mit einer erhöhten Steifigkeit erreicht, was dazu führt, dass Knochenersatzmaterialien kaum an die Eigenschaften natürlicher Knochen heranreichen.<sup>[3]</sup> Bei mechanischer Beanspruchung sollte das Material eine große Menge Energie absorbieren können, ohne dass es zum Materialversagen kommt.



**Abbildung 54: Materialzähigkeit: (A) Schematische Veranschaulichung des Versuchsaufbaus. (B) Zugmodul-Zähigkeitsdiagramm von FDM-gedruckten Einzelfilamenten: Diese Auftragung unterstreicht die gleichzeitige Erhöhung des Zugmoduls und der Zähigkeit von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> durch den Kompatibilisierungsansatz. (Zähigkeiten bis maximal 1000% Dehnung. Römische Ziffern (I)-(IV) klassifizieren die Zähigkeiten in Gruppen, die sich jeweils mit einer Signifikanz von  $p > 0.05$  unterscheiden).**

Die Zähigkeitswerte wurden aus den Zugversuchen an den Einzelfilamenten abgeleitet und bis zu einer maximalen Dehnung von 1000% berechnet. In Abbildung 54 ist ein Zugmodul-Zähigkeitsdiagramm gezeigt, welches den besonderen Einfluss der Peptid-PEG-Kompatibilisatoren auf die Materialeigenschaften hervorhebt. Verglichen mit anderen Polymer-Partikel-Kompositen, die aus praktischen Gründen meist nur aus zwei Komponenten bestehen, zeigten die grenzflächenstabilisierten PCL-Komposite ein bemerkenswertes Verhalten. Neben der Steigerung des Zugmoduls konnte die Zähigkeit von PCL durch Zugabe von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> von  $(143 \pm 34) \text{ MJ m}^{-3}$  auf  $(273 \pm 29) \text{ MJ m}^{-3}$  gesteigert werden. Das entspricht einer Erhöhung der Zähigkeit von +91% bei einem

simultanen Anstieg der Steifigkeit. Komposite mit 1 wt% pMgF<sub>2</sub> konnten die Zähigkeit des PCLs lediglich bei  $(148 \pm 12) \text{ MJ m}^{-3}$  aufrechterhalten. Damit profitierte die mechanische Robustheit der Komposite entscheidend von der Grenzflächenstabilisierung und -kompatibilisierung durch das MgF<sub>2</sub>-affine MBC. Die maximale Verbesserung bei 1 wt% cMgF<sub>2</sub> ist am vielversprechendsten für weitere Analysen, weil diese Zusammensetzungen E-Moduln und Streckgrenzen im Bereich von trabekulärem Knochen (Spongiosa) erreichte.<sup>[21b]</sup>

In parallelen Arbeiten von Samsoninkova et al. mit Modellkompositen bestehend aus PEO ( $M_n = 900 \text{ kDa}$ ) und MgF<sub>2</sub>, welches analog mit MBC kompatibelisiert wurde, war mit der mechanischen Verstärkung auch eine Erhöhung der Kristallinität der Polymer-Matrix zu verzeichnen.<sup>[188]</sup> Um den Einfluss des Kristallinitätsgrads  $X_c$  auf die 3D-gedruckten Komposite in dieser Arbeit zu überprüfen, wurden diese mit Hilfe der dynamischen Differenzkalorimetrie (engl. *dynamic scanning calorimetry*, DSC), XRD und Raman-Spektroskopie untersucht.

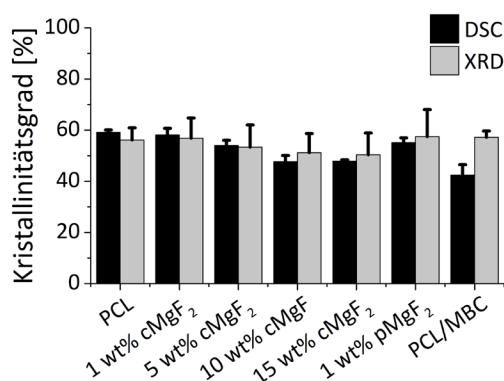
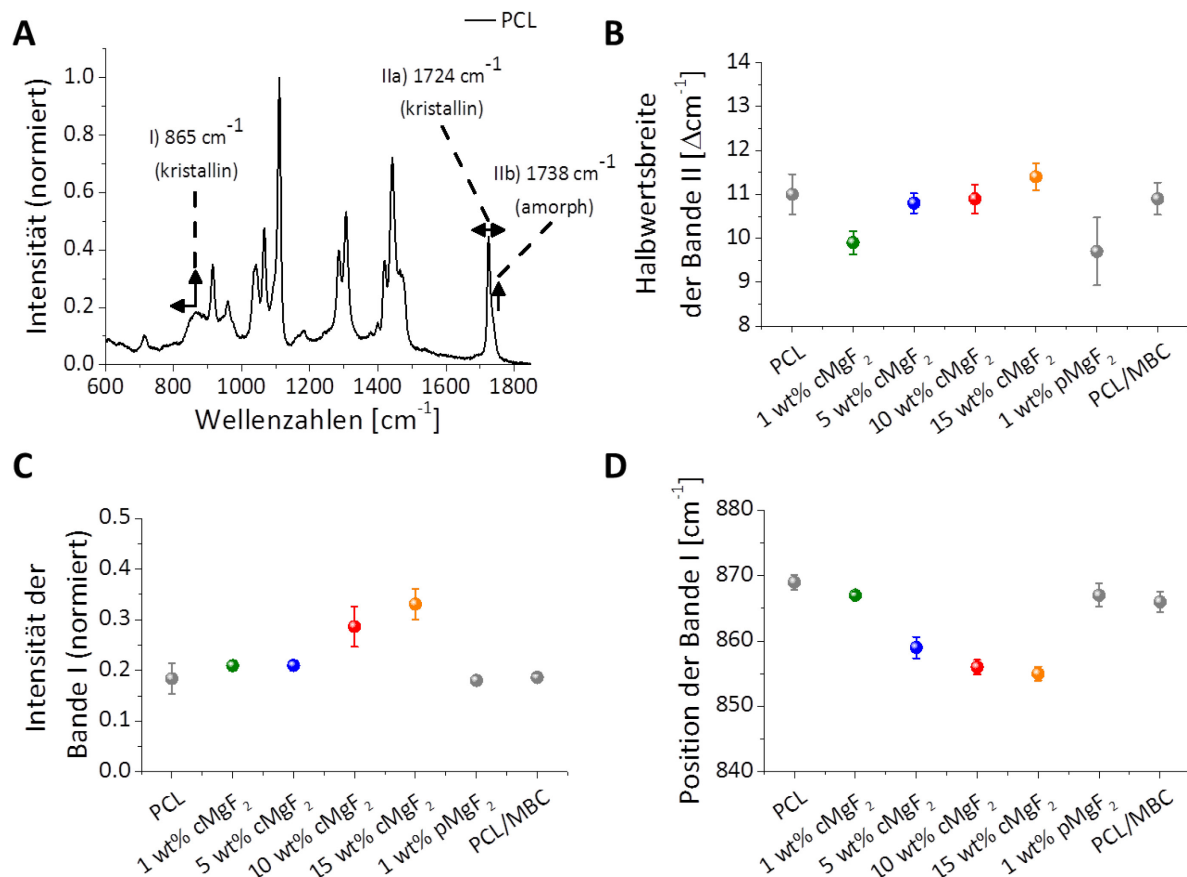


Abbildung 55: Kristallinitätsgrade der mit FDM prozessierten Komposite, PCL und PCL/MBC bestimmt mit Hilfe von DSC-Messungen (Mittelwert des zweiten und dritten Heiz/Kühlzyklus) und XRD-Messungen der 3D-Gerüste in Transmissionsgeometrie.

Sowohl bei der kalorimetrischen Auswertung der zweiten und dritten Schmelzzyklen als auch bei der Integration der kristallinen Reflexe bei  $2\theta = 21.3^\circ$  und  $23.7^\circ$  zeigten sich keine signifikanten Trends oder Unterschiede, die eine derartig große mechanische Verbesserung erklären würden (Abbildung 55). Ein steigendes Maß an anorganischen Partikeln senkte  $X_c$  sogar leicht. Demnach wirkte ein höherer Füllgrad von cMgF<sub>2</sub> inhibierend auf die Rekristallisation des PCLs.<sup>[189]</sup> Kristallinitätsinduzierte Änderungen von Raman-Banden, die entweder den kristallinen oder den amorphen Anteilen des PCLs zugeordnet werden, bestätigten diesen Zusammenhang (Abbildung 56 A).

Die isolierte Bande zwischen  $1710\text{--}1750\text{ cm}^{-1}$ , welche aus der C=O-Streckschwingung resultiert, eignet sich besonders für die Untersuchung der Kristallinität.<sup>[190]</sup> Das intensivere Signal bei  $1724\text{ cm}^{-1}$  innerhalb dieser einhüllenden Bande wird kristallinem PCL zugeschrieben, während die leicht verschobene Bande bei  $1738\text{ cm}^{-1}$  von amorphen PCL verursacht wird. Die ansteigende Halbwertsbreite dieser Bande ist ein Zeichen für einen erhöhten amorphen Anteil im Komposit (Abbildung 56 B).

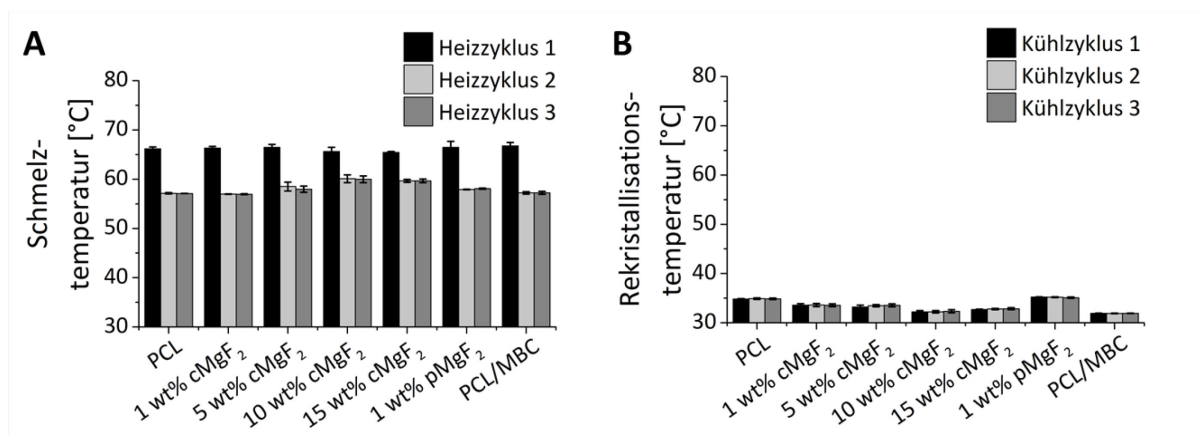


**Abbildung 56:** Kristallinitätsinduzierte Veränderungen in den Raman-Spektren von PCL auf Grund der unterschiedlichen Zusätze: (A) Typisches Spektrum von PCL mit Änderungen (Pfeile), die durch die veränderte Kristallinität des PCLs hervorgerufen werden. (B) Halbwertsbreiten der Bande bei  $1724\text{ cm}^{-1}$  sind beeinflusst durch eine prominente Bande bei  $1738\text{ cm}^{-1}$  von amorphem PCL. (C) Raman-Intensität bei  $865\text{ cm}^{-1}$  wird amorphem PCL zugeordnet. (D) Verschiebung der Raman-Bande bei ca.  $865\text{ cm}^{-1}$  von amorphem PCL.

Weitere messbare Veränderungen auf molekularer Ebene ließ die breite Bande um  $865\text{ cm}^{-1}$  erkennen, die ebenfalls dem amorphen PCL-Anteil zugeordnet wird.<sup>[191]</sup> Eine zunehmende Intensität (Abbildung 56 C), sowie eine Verschiebung zu kleineren Wellenzahlen wurde in der Literatur bereits als Zunahme des amorphen Anteils interpretiert (Abbildung 56 D).<sup>[190-191]</sup> Für die kompatibilisierten Hybridmaterialien konnte mit steigendem Füllgrad ein wachsender amorpher Anteil festgestellt werden, was die Erkenntnisse aus den anderen Kristallinitätsuntersuchungen stützt.

Die nach der Scherrer-Gleichung abgeschätzten Kristallitgrößen der kristallinen Bereiche innerhalb der Proben variierten in einem Bereich zwischen 27 nm und 29 nm nur wenig und scheiden damit als Grund für die mechanische Verstärkung aus.<sup>[192]</sup> Somit ist die Ursache der mechanischen Verstärkung der Materialien wahrscheinlich allein die Anwesenheit und homogene Verteilung der harten Füllpartikel wie es bereits für andere Kompositsysteme beschrieben wurde.<sup>[193]</sup> Hierfür scheint die Grenzflächenstabilisierung der  $\text{MgF}_2$ -Partikel essenziell, weil dadurch die Agglomeration der Partikel signifikant verringert wurde. Auf diese Weise konnte eine wesentlich bessere Dispersität der Partikel im Material erreicht werden, ohne Defektstellen im Materialverbund zu generieren.

Der Anstieg der Zähigkeit hingegen lässt sich auf die vermittelnden Wechselwirkungen der Biokonjugate zurückführen, wie es von Seidt et al. am Beispiel der bereits erwähnten PEO/MBC/ $\text{MgF}_2$ -Modellkomposite evaluiert werden konnte.<sup>[186b]</sup> So konnte aus mechanischen Zugversuchen begleitet durch In Situ-SAXS-Messungen abgeleitet werden, dass die Konjugate die Partikel effektiv in der Polymer-Matrix verankern. Dadurch verstärken diese die amorphen Bereiche des Matrixpolymers und beschleunigen gleichzeitig den Energieübertrag von den amorphen auf die kristallinen Matrixbereiche. Außerdem verwiesen die Ergebnisse der DSC-Messungen darauf, dass die Prozessierung bspw. durch 3D-Druckverfahren wie FDM einen Einfluss auf die Materialeigenschaften hat. Dies ging aus Vergleichen der verschiedenen Heiz/Kühlzyklen während der DSC-Messungen hervor (Abbildung 57).

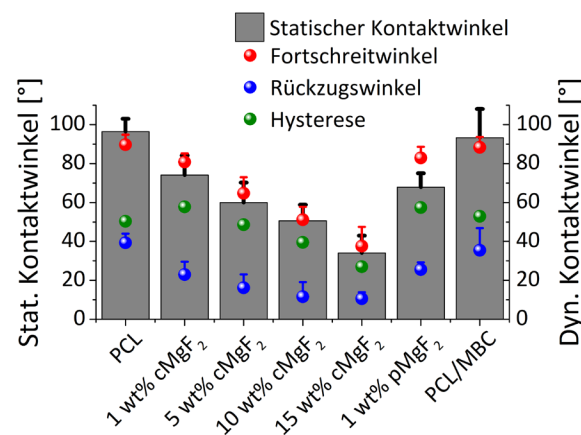


**Abbildung 57:** DSC-Analyse der FDM-prozessierten Gerüste: (A) Schmelztemperaturen und (B) Rekristallisationstemperaturen der drei Heiz/Kühlzyklen. Additive Fertigungsverfahren wie FDM haben einen Einfluss auf Materialeigenschaften wie die Schmelztemperatur.

Die thermische Historie der Gerüste beeinflusste somit die Schmelzpunkte der PCL-basierten Materialien und deren Kristallinität. Das liegt zum einen daran, dass die

gedruckten 3D-Gerüste während des ersten Aufheizens verschiedene Kontaktflächen im Messtiegel hatten. Zum anderen ist im ersten Zyklus die thermische Vorgeschichte der Proben zu berücksichtigen. Diese wird bei thermischen 3D-Druckverfahren u. a. durch die Verarbeitungstemperatur und die Abkühlraten beeinflusst, was sich letztendlich auch in der Kristallinität der Materialien bemerkbar macht.

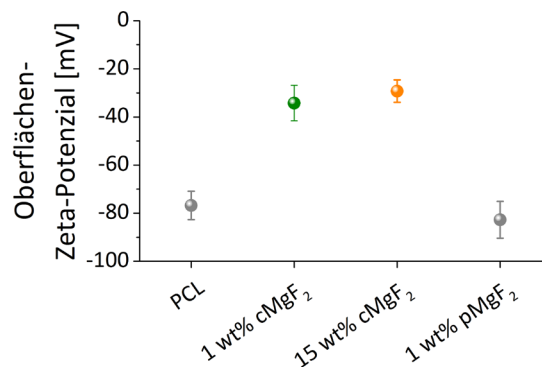
### 3.2.1.3 Oberflächeneigenschaften



**Abbildung 58:** Statische und dynamische Kontaktwinkel auf bündig gedruckten Einzelschichten aus PCL und Kompositen (Statisch: gemessen an ruhenden Wassertropfen. Dynamisch: gemessen im zeitlichen Verlauf beim Vergrößern bzw. Verkleinern ruhender Wassertropfen,  $2 \mu\text{L s}^{-1}$ . Fehlerbalken sind zur besseren Übersichtlichkeit nur halbseitig dargestellt).

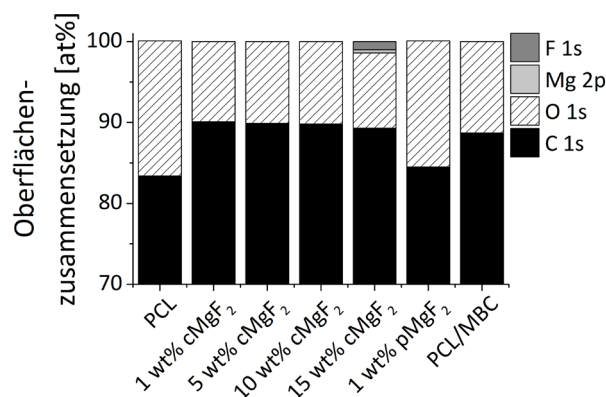
Weitere wichtige Einflussgrößen für Biomaterialien sind die Oberflächenchemie, die Benetzbarkeit in wässriger Umgebung und die Topologie, da sie die Zelladhäsion und -vermehrung steuern.<sup>[35b, 194]</sup> Um den hydrophoben Charakter der PCL-Polymere und -Komposite zu quantifizieren, wurden statische und dynamische Kontaktwinkel auf FDM-prozessierten, flachen Einzelschichten bestimmt (Abbildung 58). Die Verarbeitung von PCL und PCL/MBC lieferte Materialien mit Kontaktwinkeln von  $(96 \pm 7)^\circ$  bzw.  $(93 \pm 15)^\circ$ , welche die Hydrophobizität der Oberflächen bestätigten. Durch die Einarbeitung von  $\text{MgF}_2$  wurden die Kontaktwinkel auf den PCL-Kompositen kontinuierlich verringert. Das bedeutet, dass 15 wt%  $\text{cMgF}_2$  mit  $(34 \pm 9)^\circ$  die hydrophilste Oberfläche besaß. Dieser Trend bestätigte sich auch in dynamischen Messungen. Die Hysterese zwischen Fortschreit- und Rückzugswinkeln der Kompositschichten sank mit steigendem Füllgrad. Ein Grund hierfür ist die gestiegene Rauheit der Oberflächen, die in den SEM-Aufnahmen der FDM-gedruckten Gerüste zu erkennen ist (Anhang, Abbildung A5). Der Anstieg der Benetzbarkeit bei den mit MBC

stabilisierten Kompositen sollte sich positiv auf biologische Anwendungen auswirken, weil es das Eindringen und die Adhäsion von Zellen verbessert.<sup>[195]</sup>



**Abbildung 59: Oberflächen-ζ-Potenzial auf FDM-prozessierten Gerüsten: Nur cMgF<sub>2</sub> war in der Lage das negative Potenzial von reinem PCL auf den Kompositen zu erhöhen, was abstoßende Effekte an den Grenzflächen minimiert (Bedingungen: in wässriger Tracer-Lösung).**

Das Oberflächen-ζ-Potenzial, welches das ζ-Potenzial an flachen Oberflächen makroskopischer Probenkörper beschreibt, ist eine weitere Größe, um die Anlagerung von Zellen und die Zelltoxizität der Materialien zu beeinflussen.<sup>[196]</sup> Alle vermessenen Komposite wiesen negative Oberflächenpotenziale auf (Abbildung 59). Die Einarbeitung von kompatibilisiertem cMgF<sub>2</sub> in PCL konnte das Oberflächen-ζ-Potenzial von -77 mV (PCL) auf -34 mV (1 wt% cMgF<sub>2</sub>) und -29 mV (15 wt% cMgF<sub>2</sub>) anheben. Komposite mit nicht-stabilisiertem pMgF<sub>2</sub> veränderten die Oberflächenladung nicht signifikant (-83 mV), was erneut in der geringen, effektiven Füllmenge von nur 0.1 wt% pMgF<sub>2</sub> nach dem 3D-Druck begründet sein kann.



**Abbildung 60: Elementare Oberflächenzusammensetzung aus XPS-Übersichtsscans: Nur 15 wt% cMgF<sub>2</sub> zeigte integrierbare Mg 2p- und F 1s-Bindungsenergien, die exponierte Partikel an der Oberfläche anzeigen.**

Die Ursachen der erhöhten Benetzbarkeit und der Änderungen des Oberflächenpotenzials der Komposite wurden von Bharati Gupta (Gruppe von Prof. N. Motta, QUT, Brisbane, AUS) durch XPS-Analysen untersucht. Dazu wurde die elementare



Oberflächenzusammensetzung anhand der Bindungsenergien von Photoelektronen aus C 1s-, O 1s-, F 1s- und Mg 2p-Orbitalen aus Übersichtsscans quantifiziert. Die Bindungsenergie von C 1s wurde auf 285.0 eV festgesetzt. Daraus resultierten die Energien ( $532 \pm 1$ ) eV für O 1s, ( $686.0 \pm 0.1$ ) eV für F 1s und ( $51.3 \pm 0.3$ ) eV für Mg 2p. Nur beim hochgefüllten Komposit 15 wt% cMgF<sub>2</sub> konnte MgF<sub>2</sub> an der Oberfläche der Komposite detektiert werden (Abbildung 60). Dies war auch in den SEM-Aufnahmen sichtbar (Anhang, Abbildung A5).

Alle anderen Proben lieferten in den XPS-Scans keine integrierbaren Signale bei Magnesium- und Fluorid-Bindungsenergien, sondern nur Signale von Kohlenstoff- und Sauerstoff-Spezies. Das bedeutet, dass die MgF<sub>2</sub>-Partikel bei Kompositen mit Füllgraden < 15 wt% komplett im PCL eingebettet waren. Die Diskrepanz zwischen den Trends der Kontaktwinkel und der Oberflächenpotenzialmessungen bzw. den XPS-Messungen kann zum einen methodenbedingt sein. Erstere Techniken sind integrale Methoden, die die komplette Oberfläche vermessen, während XPS nur Ausschnitte der Oberfläche berücksichtigen kann. Außerdem kann die absolute Menge an hydrophilem Konjugat MBC, die mit dem MgF<sub>2</sub>-Anteil linear ansteigt und möglicherweise auch an die Oberfläche der Schmelze segregiert, für die Veränderung der Oberflächeneigenschaften sorgen wie es in anderen Polymerfaser-Anwendungen bereits genutzt wurde.<sup>[197]</sup> Die höhere Hydrophilie und die weniger geladene Oberfläche der Komposite bieten ein hohes Potenzial für spätere Zellanwendungen. Hierbei weisen wässrig benetzbarere, nicht-kationische Oberflächen in der Regel bessere Zellkompatibilität auf als kationische Oberflächenladungen.<sup>[198]</sup>

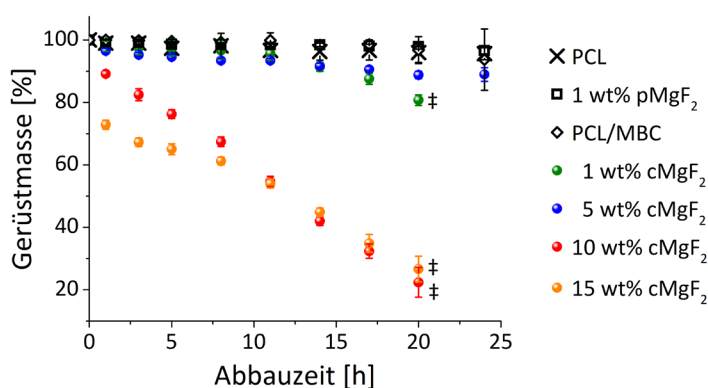
### **3.2.1.4 Hydrolytischer Abbau und Ionenfreisetzung**

Synthetische Materialien für den Knochenersatz sollten direkt nach der Implantation die nötige Stabilität zur Unterstützung der geführten Knochenselbstheilung liefern. Mit fortschreitender Regenerationszeit sollten sie allerdings kontinuierlich abgebaut werden, sodass sie nur so lange im Organismus verbleiben, bis sich neues, stabiles Knochengewebe gebildet hat.<sup>[11a]</sup> Die Anpassung der Abbauzeit an den Zeitraum der Gewebeneubildung ist eine Herausforderung, die für jede Anwendung neu angepasst werden muss.<sup>[199]</sup> Abbauraten von reinem PCL sind im Gegensatz zu anderen abbaubaren Polyestern vergleichsweise langsam.<sup>[96a]</sup> Deswegen sind besonders bei PCL-basierten Materialien einstellbare, beschleunigte Zersetzungsraten von Interesse. Um



die Abbauprofile zu untersuchen, die bei reinem PCL unter physiologischen Bedingungen 1-2 Jahre dauern können, wurden etablierte, beschleunigte AbbauprozEDUREN verwendet.<sup>[200]</sup> Alle Gerüstschnitte wurden in 5 M NaOH<sub>aq</sub>-Lösung bei 37 °C inkubiert und der Zersetzungsfortschritt gravimetrisch und morphologisch untersucht. Komposite mit 1 wt% pMgF<sub>2</sub> und PCL/MBC-Mischungen zeigten unter den gewählten Bedingungen Profile, die dem Abbau von reinem PCL gleichen (Abbildung 61).<sup>[96a, 201]</sup>

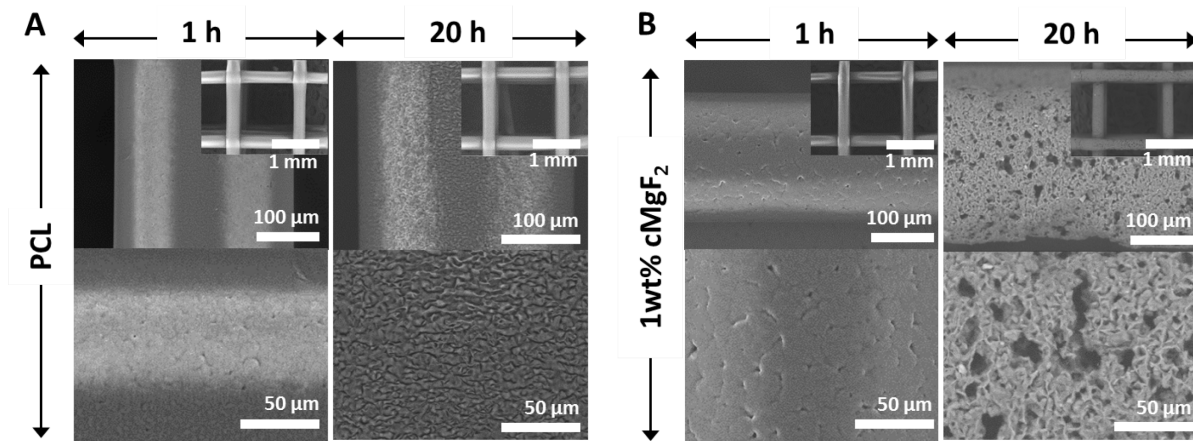
Im Gegensatz zu reinen Polyestern, in denen der Abbau durch die Hydrolyse von Ester-Bindungen dominiert wird, beschleunigte der Zusatz von Partikeln das Abbauverhalten der Komposite. Dies deckt sich mit vergleichbaren Studien von partikulären PCL-Verbundmaterialien.<sup>[200-202]</sup> Die Masse der Komposite mit 1 wt% und 5 wt% cMgF<sub>2</sub> reduzierte sich innerhalb von 20 h um 10-20%, während Materialien mit 10 wt% und 15 wt% cMgF<sub>2</sub> in der selben Zeit einen Massenverlust von 80-90% erfuhren. Komposite mit 1 wt%, 10 wt% und 15 wt% cMgF<sub>2</sub> verloren ihre mechanische Stabilität schneller. Dabei lösten sich einzelne Filamente aus dem Verbund. Gerüste mit 5 wt% cMgF<sub>2</sub> waren die einzigen Komposite mit cMgF<sub>2</sub>, die am Ende der Studie nach 72 h Inkubationszeit noch ihre Form behalten hatten. Das invertierte Verhalten von 1 wt% und 5 wt% cMgF<sub>2</sub> ist auf Netzwerkeffekte resultierend aus dem FDM-Prozess zurückzuführen, welche auch schon beim mechanischen Verhalten diskutiert wurde. Die höhere Stabilität von 5 wt% cMgF<sub>2</sub> in basischer Umgebung korrelierte mit dem maximalen Kompressionsmodul dieser Kompositgruppe.



**Abbildung 61: Beschleunigte Abbaustudie der 3D-Gerüste: Massenverluste im Verlauf der Abbaustudie.**  
<sup>(\*)</sup> Gerüste verloren ihre mechanische Stabilität und zerfielen in einzelne Filamente, sodass eine Wiedergewinnung zum Wiegen nicht mehr möglich war (Bedingungen: 5 M NaOH<sub>aq</sub>, 37 °C).

Am Beispiel von PCL mit 1 wt% cMgF<sub>2</sub> zeigten sich in SEM-Aufnahmen morphologische Veränderungen (Abbildung 62 & Anhang, Abbildung A6 im Detail). Anfänglich kam es zu einer Aufrauhung der Oberfläche und bereits nach 1 h waren erste

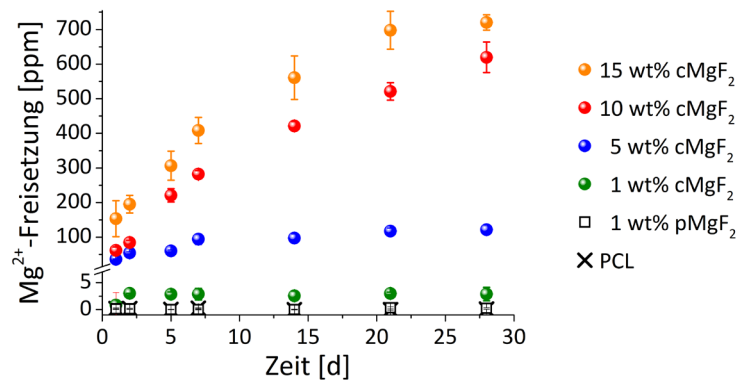
Vertiefungen zu erkennen, die sich über die Zeit ausdehnten und zur Schwächung des Materials beitrugen. Die Bildung dieser Kavitäten führte nicht nur zu einem weiter beschleunigten Abbau der Materialien, sondern erhöhte damit gleichzeitig die zugängliche Oberfläche auf den Gerüsten.



**Abbildung 62: Beschleunigte Abbaustudie der 3D-Gerüste: Repräsentative SEM-Aufnahmen von (A) reinem PCL und von (B) 1 wt% cMgF<sub>2</sub>. 1 wt% cMgF<sub>2</sub> zerfiel nach 24 h. SEM-Überblicke mit kleinerer Vergrößerung sind in den entsprechenden Bildern eingesetzt (Bedingungen: 5 M NaOH<sub>aq</sub>, 37 °C).**

Die Ergebnisse dieser Studie sind auf Grund der stark basischen Bedingungen nicht direkt auf In-vivo-Experimente übertragbar. Sie offenbarten allerdings die klare Tendenz zum schnelleren Abbau, wenn kompatibilisierte Partikel ins PCL eingebracht werden. Es kann vermutet werden, dass die ansteigende Oberfläche durch die Ausbildung der Vertiefungen dazu führt, dass mehr Fläche für Zelladhäsion und -wachstum zur Verfügung steht.<sup>[201-202]</sup>

Das Zersetzungsverhalten der Komposite war stark beschleunigt, weil sich durch den PCL-Abbau MgF<sub>2</sub>-Agglomerate herauslösten. Dadurch wurde eine noch größere Oberfläche generiert, die der umgebenden Lösung exponiert wurde. Ein Stadium der fortgeschrittenen Zersetzung wurde durch Mikroskopie-Aufnahmen besonders bei 10 wt% und 15 wt% cMgF<sub>2</sub> deutlich. In Abbildung A6 im Anhang war zu erkennen, dass schuppenförmige Bereiche von den Oberflächen abgewaschen worden waren. Grundsätzlich gilt es im Fall von PCL-Materialien als erstrebenswert, die Abbaukinetik zu beschleunigen. Durch Zusatz von cMgF<sub>2</sub> lässt sich demnach die Abbaurate der Komposite beschleunigen und abhängig von der Zusammensetzung sogar einstellen. Dies führt zu der gewünschten Annäherung der realen Abbauzeit der Knochenersatzmaterialien an die kürzere Regenerationszeit des Knochengewebes.<sup>[11a, 96a]</sup>

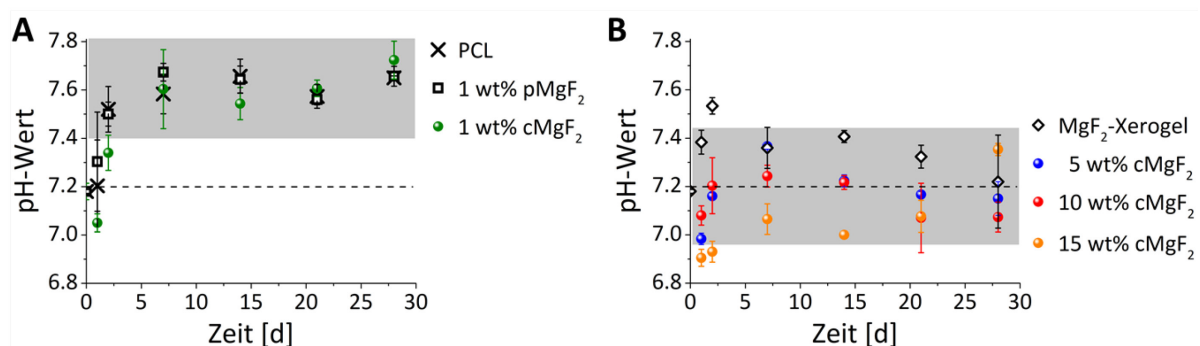


**Abbildung 63: Ionenfreisetzung im Überstand der 3D-Gerüste: Freisetzung von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen aus FDM-prozessierten Proben nach Inkubation in MEM gemessen mit ICP-OES. (Bedingungen: Gerüste in Mg-freiem Zellmedium MEM, pH-Wert vor Inkubation: pH 7.2, 37 °C)**

Auch Bedingungen wie der pH-Wert oder die freiwerdende Wirkstoff- oder Ionenkonzentrationen an der Grenzfläche zwischen Implantaten und extrazellulärer Matrix sind kritische Parameter für erfolgreiche Zellinteraktionen bei der Geweberekonstruktion. Besonders im Fall von PCL ist eine kontinuierliche Veränderung des lokalen pH-Wertes während des hydrolytischen Abbaus zu beobachten. Dies kann sich nachteilig auf die biologische Kompatibilität der Materialien auswirken. Deswegen wurden weitere Studien in einem Zellmedium unter gepufferten, physiologischen Bedingungen durchgeführt, die anwendungsnäher sind als die stark basischen Konditionen der Abbaubersuche. Die FDM-Gerüste wurden über einen Zeitraum von vier Wochen in Magnesium-freiem Zellmedium (engl. *minimum essential medium*, MEM, pH 7.2) inkubiert. Die Veränderung der pH-Werte genau wie die Freisetzung von  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen aus dem  $\text{MgF}_2$  in den Überstandslösungen über den Zeitraum der Studie bestimmt (Abbildung 63). Die optische Emissionsspektroskopie mit induktiv gekoppeltem Plasma (engl. *inductively coupled plasma-optical emission spectroscopy*, ICP-OES) wurde von Regina Granitza (Fachbereich 1.6, Bundesanstalt für Materialforschung und -prüfung) durchgeführt und ermöglichte die Messung geringer Konzentrationen an freiwerdenden  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen in der MEM-Lösung. Sie ist robust genug gegenüber den hohen Salzfrachten des Inkubationsmediums, sodass dieses ohne vorherige Entsalzung direkt analysiert werden konnte. Die  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentrationen nach 28 d (in mg  $\text{Mg}^{2+}$  pro g der inkubierten Gerüste) steigerten sich kontinuierlich mit wachsenden  $\text{MgF}_2$ -Gehalten von  $(3.0 \pm 0.3)$  ppm in 1 wt% c $\text{MgF}_2$  auf  $(720 \pm 20)$  ppm in 15 wt% c $\text{MgF}_2$ .

Der pH-Wert des zellkompatiblen Puffers veränderte sich leicht während der Inkubation der 3D-gedruckten Proben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurden die pH-Wert-Profile der verschiedenen Zusammensetzungen in zwei Gruppen aufgeteilt. Die

erste Gruppe enthielt PCL sowie beide Komposite mit 1 wt%  $\text{MgF}_2$ , die alle etwa eine pH-Änderung von  $\text{pH } \Delta 0.2$  verglichen zum Ausgangswert von pH 7.2 verursachten (Abbildung 64 A). Diese geringen  $\text{MgF}_2$ -Füllmengen konnten die Veränderungen des pH-Wertes über den Zeitraum der Studie nicht beeinflussen. Die Komposite mit Massenanteilen  $\geq 5$  wt% c $\text{MgF}_2$  und eine Referenz, die aus reinem  $\text{MgF}_2$ -Xerogelpulver in MEM bestand, bildeten die zweite Gruppe (Abbildung 64 B). Die höher gefüllten Komposite tragen dazu bei, den Ausgangs-pH-Wert (gestrichelte Linie bei pH 7.2) auch nach 28 d aufrechtzuhalten. Dieses Verhalten ist in späteren Anwendungen hilfreich, weil die Komposite konstant milde Bedingungen an der Grenzfläche zwischen Implantat und Organismus bewahren können.



**Abbildung 64:** pH-Werte im Überstand der 3D-Gerüste nach Inkubation in MEM: Zusammensetzungen, bei denen es (A) zu einem pH-Anstieg bzw. (B) zu einer pH-Stabilisierung kam (Bedingungen: Gerüste in  $\text{Mg}$ -freiem Zellmedium MEM, pH-Wert vor Inkubation: pH 7.2 (gestrichelte Linie), 37 °C).

Da die Oberflächeneigenschaften für die Zellwechselwirkungen entscheidend sind, wurden nach der vierwöchigen Inkubation in MEM EDX-Messungen an den 3D-Gerüsten vorgenommen, um diese auf mineralische Ablagerungen zu untersuchen. Die Elementzusammensetzung von 1 wt% c $\text{MgF}_2$  zeigte im Vergleich zu reinem PCL leicht erhöhte Anteile von Calcium und Phosphor (Abbildung 65). Das spricht dafür, dass sich eine geringe Menge einer Calciumphosphat-Spezies aus dem Medium abgelagert hat. Diese unterstützt nachweislich biologische Mineralisierungsprozesse in partikulären Polymer-Systemen.<sup>[203]</sup> Die nachträgliche Beschichtung von Implantaten mit Calciumphosphat ist deswegen in *Tissue Engineering* sogar eine etablierte Strategie zur Erhöhung der Bioaktivität.<sup>[203a, 204]</sup>

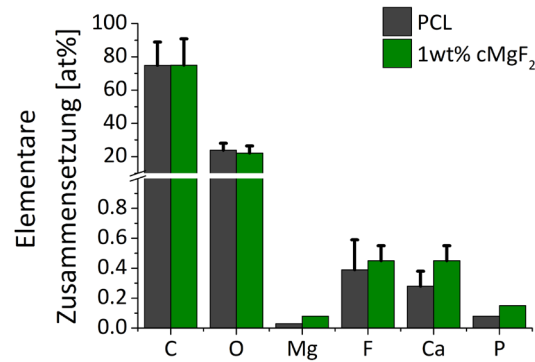


Abbildung 65: Elementare Zusammensetzung nach EDX-Analyse: Leichter Anstieg von Calcium- und Phosphor-Spezies von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> im Vergleich mit reinem PCL nach der Inkubation in MEM.

### 3.2.1.5 In-vitro-Untersuchungen der FDM-Gerüste

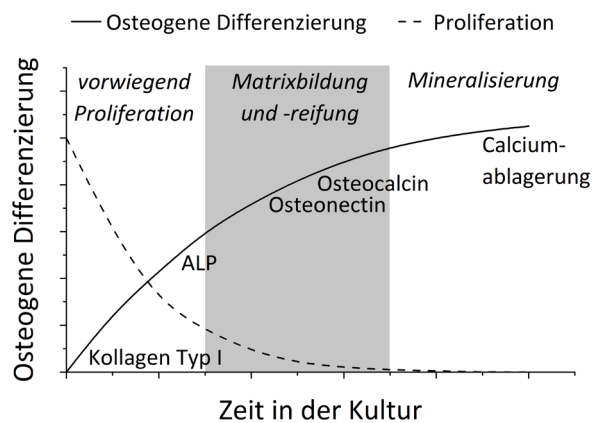
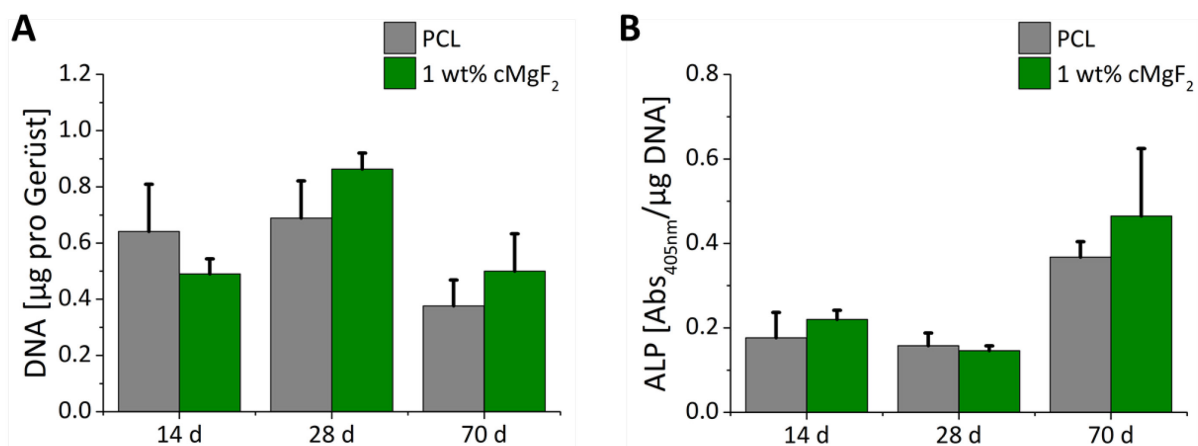


Abbildung 66: Schematischer Ablauf der osteogenen Differenzierung unterteilt in die Anfangsphase mit vorwiegendem Zellwachstum, die Phase der Bildung und Reifung der extrazellulären Matrix und der Mineralisierung des Knochengewebes (nach <sup>[205]</sup>).

Nachdem ausführliche Studien über die Eignung der FDM-gedruckten Komposite in Bezug auf die Stabilität, die Oberflächenbeschaffenheit und andere biologisch relevante Parameter evaluiert wurden, führte Cédryck Vaquette (Gruppe von Prof. Hutmacher, IHBI/QUT, Brisbane, AUS) biologische In-vitro-Untersuchungen durch, die eines der wichtigsten Untersuchungsstadien für Biomaterialien darstellt. Hierzu wurden mesenchymale Stammzellen menschlichen Ursprungs (engl. *human mesenchymal stem cells*, hMSCs) eingesetzt. Diese Vorläufer der Bindegewebszellen, die sich u. a. in knochenbildende Osteoblasten differenzieren können, wurden über einen Zeitraum von zehn Wochen in osteogenem Medium gemeinsam mit den FDM-Gerüsten kultiviert. Die Biokompatibilität und die Eignung als Gerüste für die Knochenneubildung wurden

anhand der Zellfortpflanzung (Proliferation) bzw. der Expression von alkalischer Phosphatase (ALP) untersucht (Abbildung 66).

Die Proliferation der hMSCs gelingt nur, wenn diese sich auf den 3D-Strukturen ansiedeln können und dort ausreichend milde, nicht toxische Bedingungen vorfinden. Sie wurde quantifiziert, indem die Konzentration doppelsträngiger DNA (dsDNA) im Zelllysats der auf den Gerüsten angesiedelten hMSCs gemessen wurde. Die DNA wurde mittels eines fluoreszenzbasierten PicoGreen®-Assays quantifiziert (Abbildung 67 A). Die DNA-Menge war nach zwei Wochen für die Kontrollgruppe mit reinen PCL-Strukturen noch größer als auf den 1 wt% cMgF<sub>2</sub> Kompositen. Das änderte sich mit fortschreitender Wachstumszeit, sodass nach vier und zehn Wochen mehr Zellwachstum in der Kompositgruppe mit 1 wt% cMgF<sub>2</sub> nachzuweisen war. Dies spricht für eine gute Biokompatibilität des stabilisierten Komposits, die mit der von reinem PCL vergleichbar ist.

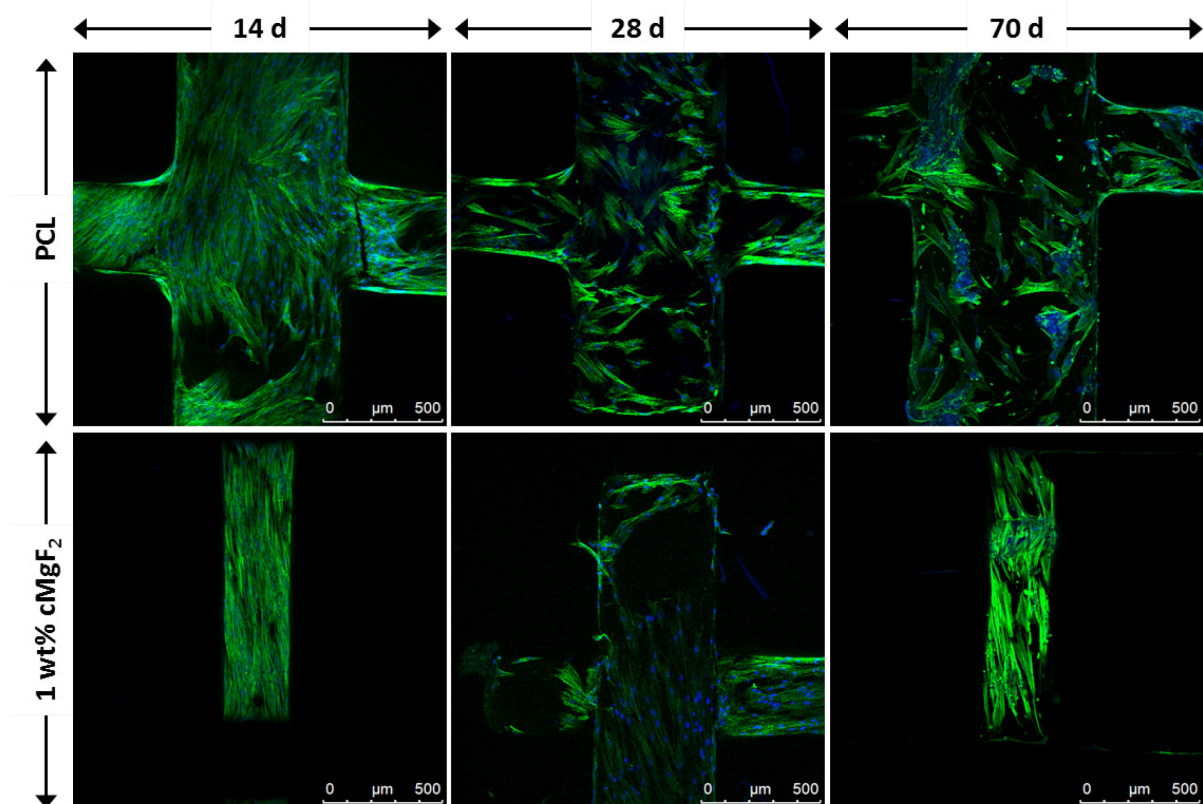


**Abbildung 67:** In vitro-Studie mit hMSCs auf FDM-gedrucktem PCL und 1 wt% cMgF<sub>2</sub>: (A) DNA-Gehalt im Zelllysats normiert auf die Gerüste. (B) ALP-Aktivität als Maß für die knochenbildende Aktivität der Zellen normiert auf den DNA-Gehalt. (Bedingungen: Inkubation in osteogenem Medium über zehn Wochen, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre).

Der Nachweis von ALP im Medium ist eine Möglichkeit, die Differenzierung von Stammzellen zu verfolgen. ALP ist ein Enzym, das Phosphorsäureester hydrolysiert und u. a. von Osteoblasten exprimiert wird, die aus der Differenzierung von hMSCs hervorgegangen sind. Es spielt eine Rolle bei der Knochenbildung (Osteogenese) und wird vermehrt am Ende der Proliferation sowie zu Beginn der Bildung der extrazellulären Matrix abgesondert (Abbildung 66).<sup>[205a]</sup> Außerdem wird neuer Knochen bevorzugt in Bereichen mit hoher lokaler ALP-Konzentration mineralisiert. Deshalb wird ALP als Maß für die Differenzierung von MSCs in knochenbildende Zellen (osteogene Differenzierung) und damit als früher Marker für die Knochenbildung



angesehen.<sup>[206]</sup> Die Quantifizierung erfolgte über einen *p*-Nitrophenyl-basierten Assay, wobei die Absorptionswerte auf die DNA-Menge normiert wurden (Abbildung 67 B). Die ALP-Mengen, die von den Zellen auf den Kompositen sowie von denen auf der Kontrollgruppe exprimiert wurden, unterschieden sich zu keinem der vermessenen Zeitpunkte signifikant voneinander. Der Anstieg der ALP-Konzentration nach 70 d bei zeitgleicher Abnahme der DNA-Menge spricht für eine erhöhte ALP-Aktivität der Zellen, welche eine Folge einer vermehrten Differenzierung der hMSCs auf den Gerüsten ist. Dies unterstreicht erneut die Biokompatibilität des Komposits auf dem Niveau des PCLs auch für knochenbezogene Anwendungen.



**Abbildung 68:** In-vitro-Studie mit hMSCs auf FDM-gedrucktem PCL und 1 wt% cMgF<sub>2</sub>: Konfokale Fluoreszenzmikroskopie-Aufnahmen von den inkubierten Gerüsten, Zellkerne in blau und Zellskelette in grün markiert (Bedingungen: Inkubation in osteogenem Medium über zehn Wochen, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre).

Durch die bildgebende, konfokale Fluoreszenzmikroskopie konnte die Anlagerung der Zellen auf den 3D-Strukturen visualisiert werden. Dafür wurden Zellen zunächst auf den Gerüsten fixiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, blau) und das Cytoskelett durch fluoreszentes Phalloidin (grün) fluoreszenzmarkiert. Auf den Bildern in Abbildung 68 ist die Zelladhäsion und -proliferation nachzuverfolgen, die sich durch elongierte Zellen ausdrückt. Zu allen Zeitpunkten und für beide Gruppen war eine flächendeckende, homogene

Oberflächenbelegung durch filamentöses Aktin zu erkennen, aus dem das Cytoskelett hauptsächlich besteht. Letztendlich konnte dem Komposit mit 1 wt% cMgF<sub>2</sub> eine Biokompatibilität auf dem Niveau des reinen PCLs nachgewiesen werden, welches ein allgemein akzeptiertes und für klinische Knochenregenerationstherapien zugelassenes Material ist.<sup>[11a, 185a]</sup> Die Ergebnisse untermauern, dass kompatibilisierte PCL/MgF<sub>2</sub>-Komposite mit niedrigen Füllmengen und erstaunlicher mechanischer Verstärkung das Potenzial zum synthetischen Biomaterial besitzen. Das In-vitro-Verhalten wurde durch die Beimengung des Peptid-PEG-Konjugats und 1 wt% MgF<sub>2</sub> nicht beeinflusst.

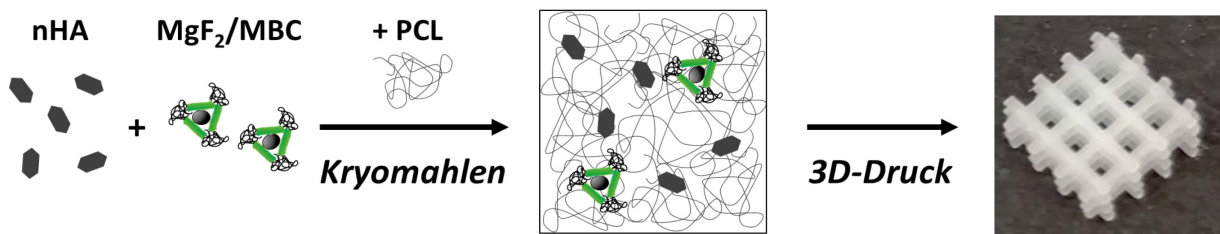
### **3.2.1.6 Teilzusammenfassung**

Die Stabilisierung der internen Grenzflächen in Kompositmaterialien durch Peptid-PEG-Konjugate hat sich als sehr erfolgreich für die Optimierung der Materialeigenschaften herausgestellt. Die Prozessierbarkeit der partikulären Polymerschmelzen mit additiven Fabrikationsmethoden wie FDM und MEW konnte vereinfacht bzw. erst ermöglicht werden. Ausgehend von der Größenstabilisierung des MgF<sub>2</sub>-Sols durch die Beschichtung mit den peptidischen Biohybriden wurden homogene, gut dispergierte Partikelverteilungen realisiert. Damit konnte die Stabilisierung in Lösung erfolgreich auf die Kompatibilisierung in Verbundwerkstoffen erweitert werden. Außerdem verbesserten die Kompatibilisatoren den Zusammenhalt zwischen den anorganischen Partikeln und der organischen PCL-Matrix, was zu einem effektiveren Energietransfer unter Belastung führt und für mechanische Materialverstärkungen sorgt. Anstiege der elastischen Moduln in allen mechanischen Tests heben die Bedeutung der Kompatibilisierung hervor, durch die E-Moduln im Bereich von natürlichem, trabekulärem Knochen erreicht wurden. FDM-Gerüste bewiesen einstellbare Abbau- und Freisetzungsraten und hydrophilere Oberflächeneigenschaften, was sie flexibel auf verschiedene Problemstellungen der Geweberekonstruktion anpassbar macht. Niedrige Füllgrade von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> erwiesen sich als kosteneffiziente Zusammensetzungen mit hoher mechanischer Optimierung, die sich in In-vitro-Zellstudien genauso biokompatibel zeigten wie das etablierte PCL.



### 3.2.2 3D-Komposite mit mechanisch-biologischer Verbesserung<sup>[182]</sup>

Auf Grund der hohen Ansprüche an Materialien für die unterstützte Knochenheilung müssen potenzielle Ersatzmaterialien die nötige mechanische Stabilität und Bioaktivität bieten. Besonders bioresorbierbare Polymere, die sich leicht durch 3D-Druckverfahren zu definierten Strukturen mit hoher Porosität verarbeiten lassen, konnten in klinischen Studien bereits ihr Potenzial demonstrieren.<sup>[57b, 207]</sup> Eine effektive Methode zur mechanischen Verstärkung organischer Polymere wurde im vorigen Kapitel bereits vorgestellt. Dabei zeigten die Komposite eine vergleichbare Biokompatibilität wie das reine Polymer. Im nächsten Schritt der Weiterentwicklung künstlicher Knochenersatzmaterialien sollen nun zwei weitere, entscheidende Faktoren optimiert werden (Abbildung 69).



**Abbildung 69:** Schema der Präparation und Verarbeitung von PCL/MgF<sub>2</sub>-Kompositen mit MBC-stabilisierten Grenzflächen für mechanisch-biologische Verbesserungen.

Zum einen sollen neben der mechanischen Verstärkung der Polymermaterialien die biologische Aktivität zur Unterstützung der Osteokonduktion und der Osteoinduktion erhöht werden. Außerdem soll eine neue Methode der Kompositherstellung evaluiert werden, die ohne die zusätzliche Nutzung von organischen, potenziell schädlichen Lösungsmitteln auskommt. Der Aspekt der biologischen Aktivierung soll durch die Zugabe von Hydroxylapatit-Nanokristalliten (nHA) erreicht werden. Diese sind Bestandteil natürlicher Knochen und deswegen auch häufig genutzte Additive in synthetischen Systemen.<sup>[208]</sup> nHA ist bekannt für seine Biokompatibilität und für eine erfolgreiche Osteoinduktivität,<sup>[20]</sup> wodurch es Osteoblasten als Ankerpunkt und Baumaterial dient. Um die Kompositherstellung aus toxikologischen Gesichtspunkten sicherer zu gestalten, wurden die Komposite mit Hilfe eines lösungsmittelfreien Mischverfahrens homogenisiert. Bei Biomaterialien, die den Weg zur medizinischen Anwendung schaffen sollen, muss der komplette Herstellungsprozess inklusive der anfänglichen Vermischung und Homogenisierung der Einzelkomponenten berücksichtigt werden. Bioabbaubare Polyester wie PCL sind allerdings wasserunlöslich, was einen Mischvorgang aus einer homogenen Lösung heraus nur zulässt, wenn ein

organisches, potenziell gesundheitsschädliches Lösungsmittel (z. B. Chloroform) verwendet wird. Andere Homogenisierungsmethoden, die ohne zusätzliche Lösungsmittel auskommen und die Materialien als Schmelze verarbeiten (z. B. Knetter oder Doppelschneckenextruder), benötigen hingegen erhöhte Temperaturen. Außerdem werden die Materialien dabei Scherkräften ausgesetzt. Dies kann besonders bei biologischen Bestandteilen wie Proteinen zur Thermodenaturierung und somit zum Funktionsverlust oder zum vorzeitigen Abbau synthetischer Polymerketten führen.<sup>[209]</sup> Aus diesen Gründen wurde das Kryomahlen (engl. *cryomilling*) gewählt, bei dem die Homogenisierung der Komponenten ohne zusätzliche Lösungsmittel und bei konstant niedrigen Temperaturen erfolgt. Durch die externe Kühlung mit flüssigem Stickstoff werden die Komponenten dabei soweit versprödet, dass auch thermoplastische Polymere sich mit einer Kugelmühle vermahlen und mischen lassen, ohne dass dabei die Komponenten ihre Zusammensetzung oder Funktion verändern.<sup>[210]</sup> Diese Art der Prozessierung erzeugt aus dem Polymergranulat Partikel im µm-Bereich (Partikeldurchmesser vor der Verarbeitung: ca. 3 mm), sodass die Verteilung der Füllstoffe auch im festen Zustand verbessert wird.<sup>[211]</sup> Dies ist sowohl für die mechanische als auch für die biologische Funktionalität essenziell.

Mit Hilfe des Kryomahlens hat Jing Lim (Gruppe von Prof. S.-H. Teoh, Nanyang Technological University (NTU)) ternäre Komposite aus PCL, MBC kompatibilisiertem  $\text{MgF}_2$  (cMgF<sub>2</sub>) und nHA gemischt und homogenisiert. Die so erhaltenen Rohkomposite wurden erneut durch FDM aus der Schmelze zu definierten, hochporösen 3D-Gerüsten verarbeitet. Die Gerüstarchitektur wurde vergleichbar zu der des vorigen Kapitels gewählt (Abbildung 69). Allerdings wurde auf Grund des Schwerpunkts auf die biologischen In-vitro-Studien der Filamentabstand von 1.6 mm auf 1.0 mm verringert, um die Zellbesiedlung zu erleichtern. Wegen der leicht veränderten Struktur und der zu erwartenden Einflüsse der alternativen Homogenisierung wurden erneut die mechanischen Eigenschaften der Komposite anhand von Einzelfaser-Zugversuchen und Kompressionstests an den Gerüsten untersucht. Neben beschleunigten Abbaustudien wurden außerdem ausführliche In-vitro-Untersuchungen durchgeführt, die das osteogene Potenzial von hMSCs auf den Gerüsten aufzeigen sollten.

### 3.2.2.1 Charakterisierung der Materialien

cMgF<sub>2</sub> wurde wie bereits beschrieben mit 3 mol% MBC funktionalisiert. Da hier mit nHA eine zusätzliche Partikelart und eine neue Charge MgF<sub>2</sub> zum Einsatz kam, wurden beide Füllstoffe vor der Verarbeitung zu Kompositen auf ihre Zusammensetzung und Partikelgröße untersucht. Das Pulverdiffraktogramm von MgF<sub>2</sub> zeigt wesentlich breitere Reflexe auf als das von nHA, was den nanokristallinen Charakter des Fluorids widerspiegelt (Abbildung 70).

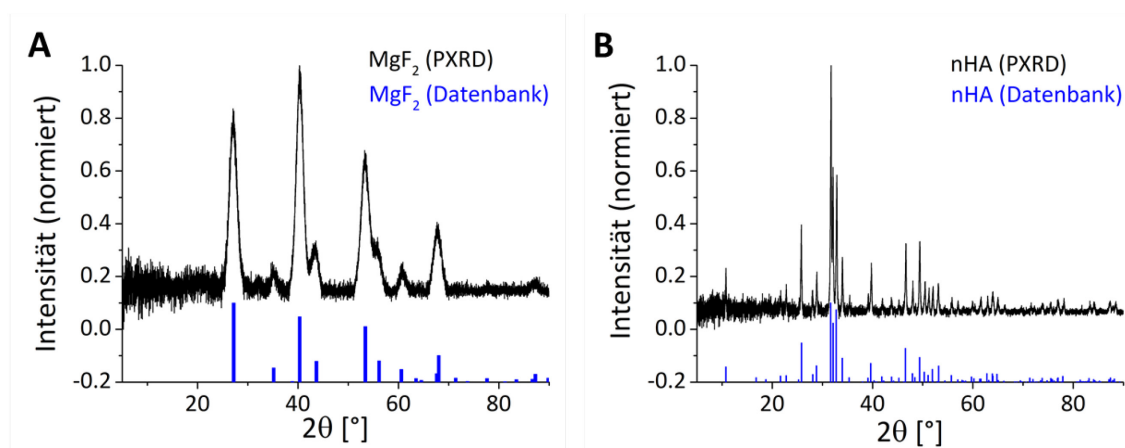


Abbildung 70: Charakterisierung der verwendeten Partikel-Chargen mittels PXRD: Diffraktogramme von (A) MgF<sub>2</sub>-Xerogel getrocknet aus dem verwendeten Sol und (B) Hydroxylapatit-Nanokristalliten (nHA) im Vergleich mit den jeweiligen Datenbankeinträgen (blaue Balken).<sup>[212]</sup>

Die DLS wurde als integrale Methode zur Bestimmung der Partikelgrößenverteilung und des  $\zeta$ -Potenzials genutzt (Abbildung 71). Die Größe der Agglomerate wurde komplementär dazu durch TEM ermittelt. Für die DLS- und  $\zeta$ -Potential-Messungen wurde nHA in Wasser und cMgF<sub>2</sub> in Methanol dispergiert. Die Oberflächenpotenziale von nHA und cMgF<sub>2</sub> lagen nahe dem Neutralpunkt (Abbildung 71 A). Sie unterschieden sich mit  $(-12 \pm 4)$  mV und  $(+12 \pm 7)$  mV allerdings im Vorzeichen, was sich grundsätzlich auf die Eigenschaften der resultierenden Materialeigenschaften der Komposite auswirken kann. Mittels Lichtstreuung ließ sich für nHA ein mittlerer hydrodynamischer Durchmesser von  $(270 \pm 120)$  nm bestimmen. Agglomerate in dieser Größe wurden ebenfalls durch die Mikroskopie nachgewiesen, wobei diese sich aus einzelnen nadelförmigen Kristalliten zusammensetzten (Abbildung 71 B). Die Nadeln waren zwischen 20-50 nm lang und etwa 5-8 nm breit. Die DLS-Messungen des kompatibilisierten cMgF<sub>2</sub> wiesen zwei Größenverteilung bei  $(13 \pm 3)$  nm und  $(110 \pm 50)$  nm auf. Auch diese Beobachtungen konnten mit Hilfe von TEM-Aufnahmen unterstützt werden. Diese zeigen Agglomerate im Bereich von 100 nm, die lose verbunden sind und aus Primärpartikeln von ca. 10 nm im Durchmesser bestehen.

Damit konnte der nanoskopische Charakter beider Materialien nachgewiesen werden. Die bimodale Verteilung des  $\text{cMgF}_2$  erklärt sich dadurch, dass in Lösung anteilig stabilisierte Primärpartikel vorhanden waren. Diese konnten auf Grund des niedrigen Z-Kontrasts nicht aufgelöst werden bzw. agglomerierten durch den Trocknungsvorgang bei der TEM-Präparation. Primärpartikel in der Größenordnung von  $< 10 \text{ nm}$  sind bereits literaturbekannt für die verwendete  $\text{MgF}_2$ -Syntheseroute.<sup>[143]</sup> Die größeren Agglomerate aus  $\text{cMgF}_2$  können der Probenpräparation zugeschrieben werden, da bereits gezeigt werden konnte, dass  $\text{cMgF}_2$ -Sole nach dem Trocknen vollständig redispergierbar sind (Kapitel 3.1.2).

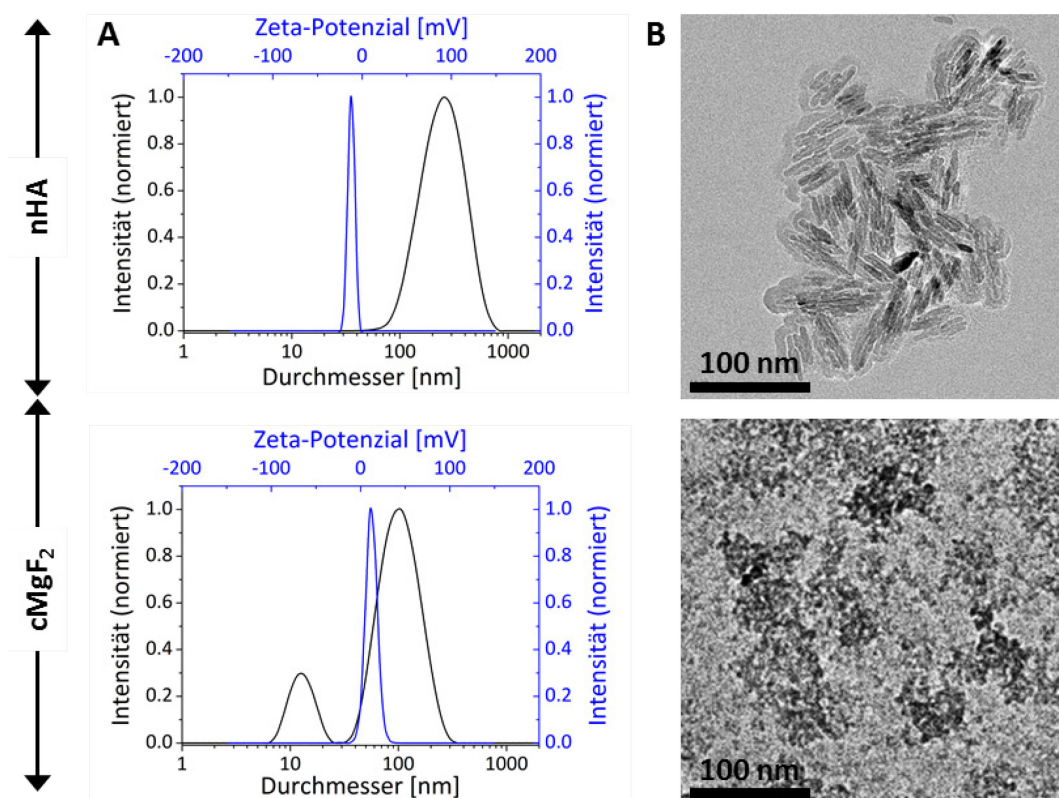


Abbildung 71: Partikelcharakterisierung von nHA (oben) und  $\text{cMgF}_2$  (unten): (A)  $\zeta$ -Potenzial und hydrodynamische Durchmesser aus DLS-Messungen und (B) repräsentative TEM-Aufnahmen.

### 3.2.2.2 Präparation der Komposite

Es wurden binäre Komposite und ein ternäres Gemisch aus PCL und nHA bzw.  $\text{cMgF}_2$  durch Kryomahlen verblendet. Dabei wurden alle Bestandteile außer dem in Methanol suspendierten  $\text{cMgF}_2$ -Sol als Feststoffe eingesetzt und bei  $-80^\circ\text{C}$  vermahlen. Anschließend wurden die Gemische durch FDM zu den gewünschten Architekturen verarbeitet. Als Referenz zum Mehrkomponentensystem  $\text{PCL}/4\text{HA}/1\text{cMgF}_2$  wurden

reines PCL und die Komposite PCL/5HA, PCL/4HA und PCL/1cMgF<sub>2</sub> hergestellt (Tabelle 3). Der schmelzbasierte Druckvorgang lieferte in Analogie zum vorigen Kapitel sowohl definierte 3D-Gerüste als auch einzelne Filamente, die später zu mechanischen Zugversuchen herangezogen werden. Alle Gerüststrukturen wiesen die gewünschte Porosität auf, bei der alle Poren innerhalb des Gerüsts miteinander verbunden waren. Des Weiteren traten keine Auffälligkeiten im Druckprozess auf (Abbildung 72 & Abbildung A7 im Detail).

**Tabelle 3: Abkürzungen und theoretische sowie nach Elementaranalysen berechnete Zusammensetzungen der Gerüste nach dem 3D-Druck.**

Probe	Zusammensetzung <sup>a</sup> theoretisch	Zusammensetzung <sup>b</sup> wt% (HA+cMgF <sub>2</sub> )
PCL	100 wt% PCL/ - / -	-
PCL/4HA/1cMgF <sub>2</sub>	95 wt% PCL/4 wt% nHA/1 wt% cMgF <sub>2</sub>	4.8 ± 0.1
PCL/5HA	95 wt% PCL/5 wt% nHA/ -	3.7 ± 0.1
PCL/4HA	96 wt% PCL/4 wt% nHA/ -	2.90 ± 0.04
PCL/1cMgF <sub>2</sub>	99 wt% PCL/ - /1 wt% cMgF <sub>2</sub>	1.0 ± 0.1

(a) cMgF<sub>2</sub> wurde mit 3 mol% MBC (relativ zu n(MgF<sub>2</sub>)) funktionalisiert. (b) Anorganische Anteile wurden nach Elementaranalysen der 3D-gedruckten Gerüste basierend auf der Differenz der Einwaagen und der molekularen Zusammensetzung von PCL nach der Formel (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub> berechnet.

Mit der Kompatibilisierung der Partikel und der Vermischung mittels Kryomahlen wurden zwei Methoden kombiniert, die die Verarbeitbarkeit durch 3D-Druckverfahren vereinfachen. Der positive Einfluss der Kompatibilisierungsstrategie wurde bereits im vorigen Kapitel detailliert gezeigt. Eine verbesserte Prozessierbarkeit durch Kryomahlen konnten Lim et al. nachweisen, indem sie stabile Polymerverbundstoffe mit bis zu 70 wt% Tricalciumphosphat (TCP) in PCL herstellen konnten.<sup>[211]</sup> Der Kryomahlprozess verringert die Größe des ursprünglichen PCL-Granulats zu einem feinen Pulver und erhöht damit die spezifische BET-Oberfläche etwa um den Faktor 60. Dadurch können die Rohstoffe bereits vor dem Aufschmelzen effizient homogenisiert werden. Die Kombination dieser beiden Methoden erleichterte die Verarbeitung der partikulären Komposite, sodass alle Zusammensetzungen erfolgreich druckbar waren. In keinem Fall waren Verstopfungen der Düsen oder durchhängende Filamente zu erkennen, was auf eine hervorragende Größenstabilisierung und Homogenisierung der Partikel zurückzuführen ist. Die schichtweise Verschmelzung zwischen den Filamenten generierte die notwendige mechanische Stabilität der Gerüste.

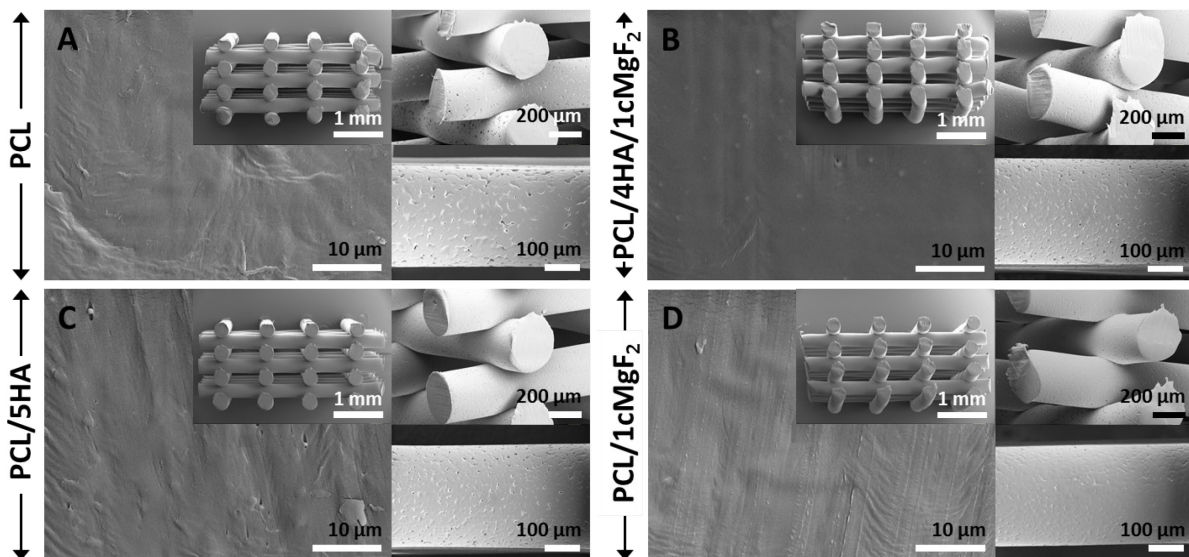


Abbildung 72: SEM-Aufnahmen der verdruckten 3D-Gerüste: (A) Reines PCL, (B) ternäres Komposit PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub>, (C) PCL/5HA und (D) PCL/1cMgF<sub>2</sub>. Gezeigt sind die Querschnitte der Filamente (große Bilder links), die Seitenansichten der Gerüste (Bildeinsätze links), die Kontaktpunkte der Filamente (oben rechts) und die Einzelfilamente in der Draufsicht (unten rechts).

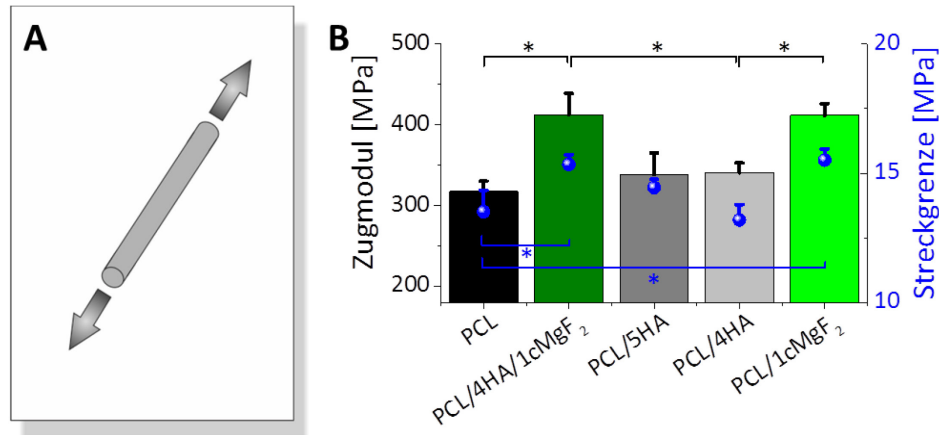
Die Zusammensetzung der Kompositgruppen wurde durch die Einwaagen der Rohstoffe in den Kryomahlbecher vorgegeben. Die tatsächlichen Zusammensetzungen nach dem FDM wurden mittels Elementaranalysen untersucht (Tabelle 3). Dabei zeigten besonders die beiden Gruppen, die cMgF<sub>2</sub> enthielten, mit  $(4.8 \pm 0.1)$  wt% (PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub>) bzw.  $(1.0 \pm 0.1)$  wt% (PCL/1cMgF<sub>2</sub>) eine starke Übereinstimmung mit den angestrebten Werten von 5 wt% bzw. 1 wt% MgF<sub>2</sub>. Mit  $(3.7 \pm 0.1)$  wt% (PCL/5HA) und  $(2.90 \pm 0.04)$  wt% (PCL/4HA) lagen die ermittelten Gehalte der Komposite, die neben PCL nur nHA enthielten, unter den erwarteten Werten. Die Tatsache, dass besonders die Gemische mit cMgF<sub>2</sub>-Beimengungen so nah an die theoretischen Zusammensetzungen heranreichten, unterstreicht erneut die gute Prozessierbarkeit der kompatibilisierten Verbundstoffe.

### 3.2.2.3 Mechanische Verstärkung

Alle Kompositgruppen wurden von Onur Bas (Gruppe von Prof. Hutmacher, IHBI/QUT) sowohl zu 3D-Gerüsten als auch zu Einzelfilamenten verdruckt, um die mechanischen Versuche durchführen zu können. An den Einzelfilamenten wurden Zugspannung-Dehnungsversuche vorgenommen, während die 3D-Gerüste den Kompressionsversuchen dienten. Dies ermöglicht, dass die Werte der mechanischen Verstärkung auch unabhängig von den Netzwerkeigenschaften der 3D-Strukturen

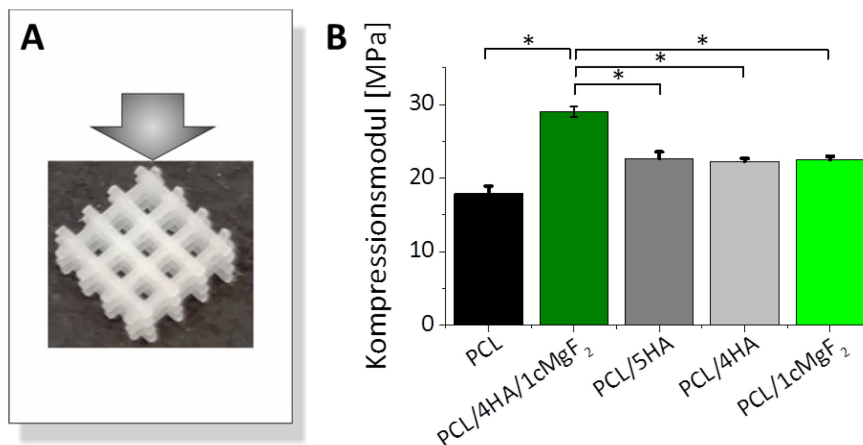


bewerten werden können. Die Filamente in diesem Kapitel besaßen mit  $(339 \pm 5) \mu\text{m}$  eine sehr enge Durchmesser-Verteilung. Diese geringen Abweichungen zwischen den Gruppen erleichtert die Interpretation der mechanischen Messungen, weil der Faktor der Filamentdurchmesser weitgehend vernachlässigt werden kann.



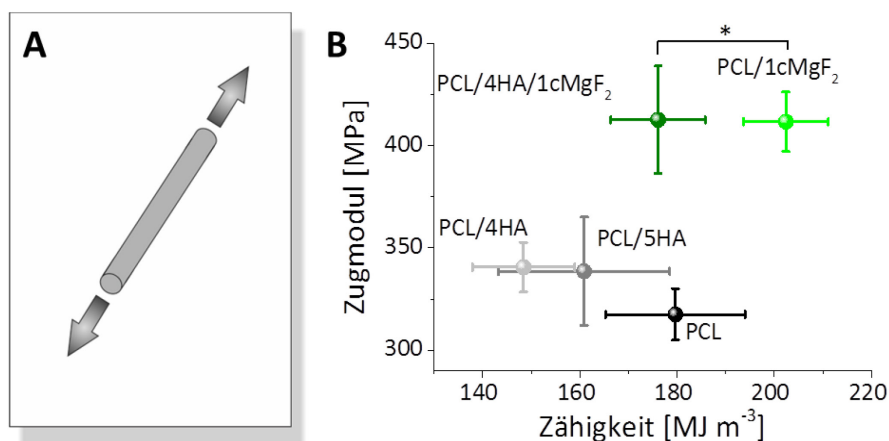
**Abbildung 73: Mechanische Zugversuche: (A) Schematische Veranschaulichung des Versuchsaufbaus. (B) Zugmoduln (Balken) und obere Streckgrenzen (blaue Punkte) der Einzelfilamente (<sup>(\*)</sup> Signifikante Unterschiede der Moduln (schwarz) und der Streckgrenzen (blau),  $p > 0.01$ ).**

Der Zugmodul  $E_{\text{Zug}}$  des kompatibilisierten, ternären Komposits PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> von  $(413 \pm 26) \text{ MPa}$  war um 30% und damit signifikant höher als der des Ausgangsmaterials PCL mit  $(318 \pm 13) \text{ MPa}$  (Abbildung 73). Einen ähnlichen Anstieg lieferte die Gruppe PCL/1cMgF<sub>2</sub> mit  $(412 \pm 15) \text{ MPa}$ . Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den nHA-gefüllten Kompositen und reinem PCL. Die Systeme PCL/5HA und PCL/4HA zeigten Moduln von  $(339 \pm 26) \text{ MPa}$  bzw.  $(341 \pm 12) \text{ MPa}$ , welche nur unwesentlich höher waren als der von PCL. Die oberen Streckgrenzen folgten dem gleichen Trend. Die Werte von reinem PCL lagen bei  $(13.5 \pm 0.8) \text{ MPa}$  und stiegen durch die Verstärkung mit 1 wt% cMgF<sub>2</sub> auf ein Maximum von  $(15.5 \pm 0.4) \text{ MPa}$  in PCL/1cMgF<sub>2</sub> an. Das ternäre Komposit PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> wies einen ähnlichen Wert von  $(15.3 \pm 0.4) \text{ MPa}$  auf, während durch nHA mit  $(13.2 \pm 0.6) \text{ MPa}$  wieder keine deutliche Verstärkung eintrat. Diese Ergebnisse stützen die Annahmen aus dem vorigen Kapitel, dass das kompatibilisierte cMgF<sub>2</sub> alleine bereits in geringen Mengen in der Lage ist, die Steifigkeit von PCL erheblich zu erhöhen. Im Gegensatz dazu verursachte eine Zugabe von nHA keine signifikanten Verstärkungen in den Zugversuchen. Dies verdeutlicht wie wirksam die Grenzflächenstabilisierung von anorganischen MgF<sub>2</sub>-Partikeln in organischen Polymeren für die Optimierung mechanischer Eigenschaften ist.



**Abbildung 74: Mechanische Zugversuche: (A) Schematische Veranschaulichung des Versuchsaufbaus. (B) Kompressionsmoduln der 3D-Gerüste (\* Signifikante Unterschiede,  $p > 0.01$ ).**

Die Zugabe von allen anorganischen Füllpartikeln führte zu erhöhten Kompressionsmoduln  $E_{\text{Komp}}$  der Gerüste (Abbildung 74). Es reichte bereits 1 wt% cMgF<sub>2</sub> aus ( $E_{\text{Komp}} = (22.5 \pm 0.4)$  MPa), um einen ähnlichen Verstärkungseffekt hervorzurufen wie in den Gerüsten mit 4 wt% und 5 wt% nHA ( $(22.3 \pm 0.4)$  MPa bzw.  $(22.7 \pm 0.9)$  MPa). Wenn beide Partikelarten eingebracht wurden, konnte ein synergetischer Effekt beobachtet werden, da sich  $E_{\text{Komp}}$  von PCL von  $(18.0 \pm 1.0)$  MPa auf  $(29.0 \pm 0.7)$  MPa erhöhte. Das entsprach einem 60%igen Anstieg bei der Gruppe PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub>. Auch hier unterstreicht dieses Verhalten erneut die Bedeutung der Grenzflächenstabilisierung.



**Abbildung 75: Materialzähigkeit: (A) Schematische Veranschaulichung des Versuchsaufbaus. (B) Zugmodul-Zähigkeitsdiagramm von FDM-gedruckten Kompositen und PCL in Form der Einzelfilamente: Diese Auftragung verdeutlicht die gleichzeitige Erhöhung des Zugmoduls und der Zähigkeit von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> durch die Kompatibilisierung (\* Signifikante Unterschiede,  $p > 0.01$ ).**

Neben den elastischen Moduln, welche die mechanischen Eigenschaften nur im linear-elastischen Bereich beschreiben, ist die Zähigkeit eine entscheidende Eigenschaft, um potenzielle Bioersatzmaterialien zu untersuchen. Wenn diese externen Belastungen



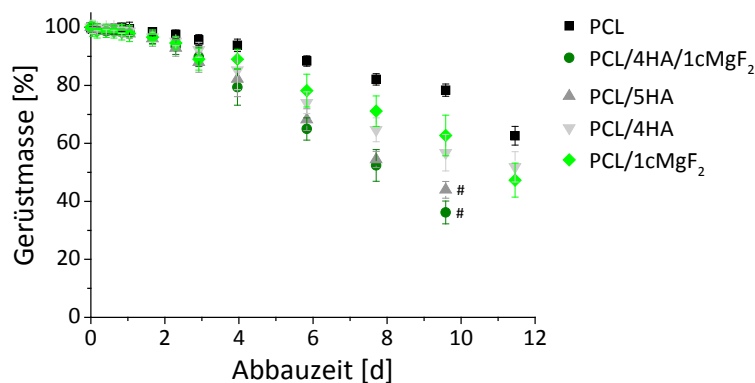
ausgesetzt werden, sollten künstliche Gerüste zur Geweberekonstruktion in der Lage sein, große Energieeinträge kompensieren zu können, ohne ihre Form und Stabilität zu verlieren. Die Integration der Spannung-Dehnungskurven erlaubte die Auftragung der Zugmoduln gegen die Zähigkeiten (Abbildung 75). Im System PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> konnte der Zugmodul erhöht werden, ohne dass sich die Zähigkeit signifikant verschlechterte. Dabei ergaben sich Zähigkeitswerte von  $(180 \pm 14) \text{ MJ m}^{-3}$  und  $(176 \pm 9) \text{ MJ m}^{-3}$  für PCL bzw. PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub>. Dies zeigte, dass reines PCL durch die Zugabe der entsprechenden Füllmaterialien steifer wurde, ohne dabei zu verspröden. Ähnliche Ergebnisse wurden für das Komposit PCL/1cMgF<sub>2</sub> erhalten, bei dem sowohl der Zugmodul als auch die Zähigkeit  $((202 \pm 9) \text{ MJ m}^{-3})$  entscheidend erhöht werden konnte. Damit wurde erneut demonstriert, dass durch die Grenzflächenstabilisierung von MgF<sub>2</sub> in Kompositen keine Kompromisse zwischen der Steifigkeit und der Zähigkeit der Verbundmaterialien mehr nötig sind. Die PCL-Komposite mit ausschließlich nHA-Anteilen hingegen wurden mit  $(160 \pm 18) \text{ MJ m}^{-3}$  (PCL/5HA) und  $(148 \pm 11) \text{ MJ m}^{-3}$  (PCL/4HA) leicht spröder.

Angesichts der komplexen, mehrschichtigen 3D-Architektur der Gerüste stellen die Zugversuche den Einfluss der Füllpartikel auf die Materialverstärkungen in den Vordergrund, weil Netzwerkeffekte vernachlässigt werden können. Hierbei ermöglichten geringe Mengen des kompatibilisierten cMgF<sub>2</sub> eine effektive Erhöhung der Steifigkeit und der Zähigkeit des PCLs, obwohl in der Literatur diskutiert wird, dass diese beiden Eigenschaften sich in synthetischen Materialien meist „gegenseitig ausschließen“.<sup>[187]</sup> In den Kompressionsversuchen waren profitierte die Kompositsteifigkeit hingegen mehr von insgesamt höheren Partikelanteilen. Auch hier verursachten bereits geringe Mengen cMgF<sub>2</sub> einen hohen Verstärkungseffekt, der allerdings von höheren Füllgraden von nHA im ternären Komposit PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> unterstützt wurde. Damit konnte ein Großteil der Veränderungen der mechanischen Eigenschaften auf die kompatibilisierten Partikel zurückgeführt werden.

### 3.2.2.4 Beschleunigter Abbau der Komposite

Synthetische Materialien, welche die Knochenheilung in vivo unterstützen und steuern sollen, müssen ein geeignetes Abbauprofil aufweisen. Die Gerüste sollten solange Stabilität gewähren bis das Knochenwachstum abgeschlossen ist. Dazu soll es allerdings möglichst schnell vom Organismus abgebaut werden, sodass sich der

neugebildete Knochen stabilisieren kann und kein künstliches Gerüstmaterial zurückbleibt. Deswegen wurde analog zu den Studien in Kapitel 3.2.1 der Polymerabbau unter beschleunigten Bedingungen in  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$  bei 37 °C untersucht (Abbildung 76). Alle Komposite zersetzten sich unter diesen Bedingungen schneller als das reine PCL.<sup>[201-202]</sup> Mit höherem Füllgrad an Partikeln wurde der Abbau zunehmend beschleunigt. Dabei bauten sich Komposite, die nur 4 wt% nHA enthielten, nur wenig schneller ab als die, denen nur 1 wt%  $\text{cMgF}_2$  zugegeben wurde. PCL/4HA/1 $\text{cMgF}_2$  zeigte im Gegensatz zu PCL/5HA im direkten Vergleich der beiden Komposite mit insgesamt 5 wt% anorganischen Partikeln die schnellere Abbaurate. Diese Ergebnisse legten einen stärkeren Einfluss des  $\text{cMgF}_2$  auf die Zersetzungsgeschwindigkeit nahe als beim nHA. Die Polymergerüste konnten auf Grund von nachlassender mechanischer Stabilität nach etwa 10 d nicht mehr für gravimetrische Messungen verwendet werden (in Abbildung 76 mit Doppelkreuz (#) gekennzeichnet). Dieser Zerfall wurde im Vergleich zu den 3D-Strukturen aus dem vorigen Kapitel 3.2.1 bereits wesentlich früher festgestellt (Abbildung 61). Dies liegt vorwiegend an der veränderten Probenarchitektur und den verwendeten Druckparametern. Entscheidend ist jedoch bei den beschleunigten Abbaustudien die Vergleichbarkeit innerhalb der Probensätze. Trotz der Unterschiede der absoluten Werte zwischen den Studien kann der direkte Einfluss der Komposit-Zusammensetzung auf die Langzeitstabilität abgeschätzt werden.



**Abbildung 76:** Massenverluste während der beschleunigten Abbaustudie der 3D-Gerüste <sup>(†)</sup> Gerüste verloren ihre mechanische Stabilität, sodass eine Wiedergewinnung zum Wiegen nicht mehr möglich war. Bedingungen: 5 M  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$ , 37 °C).

Die SEM-Aufnahmen während der Abbaustudie illustrieren die Hydrolyse der Polymer-Hybridmaterialien (Abbildung 77 & Abbildung A8 im Detail). Der Hydrolyse folgt die Auflösung der amorphen Bereiche im PCL.<sup>[200]</sup> Dabei bildeten sich nach 2-3 d erste Löcher in den Filamenten. In Kompositen mit höheren Füllgraden konnte dies wesentlich früher beobachtet werden.

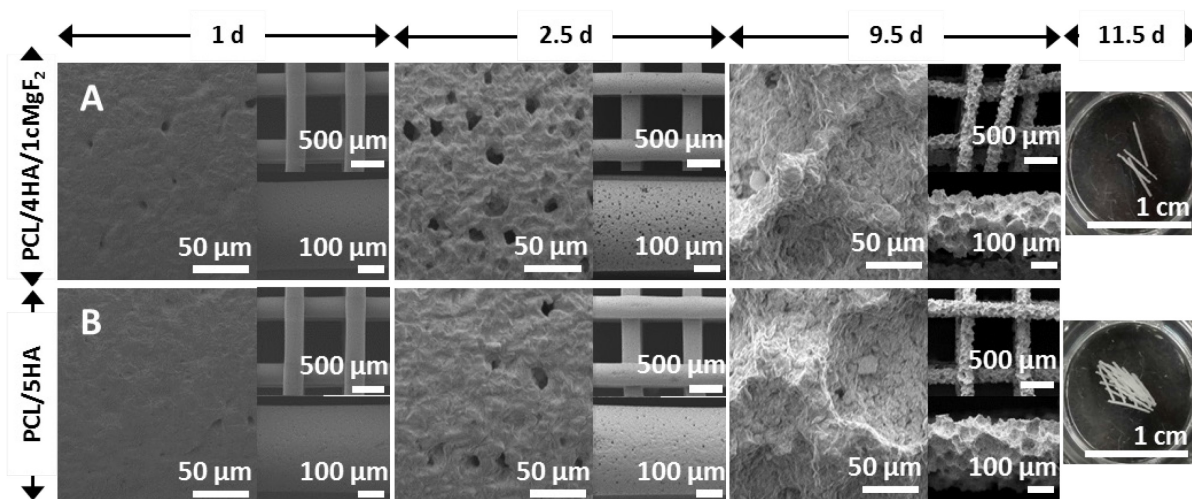


Abbildung 77: Repräsentative SEM-Aufnahmen während der beschleunigten Abbaustudie der 3D-Gerüste von (A) PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> und (B) PCL/5HA (Bedingungen: 5 M NaOH<sub>aq</sub>, 37 °C. Die größten Bilder (links) zeigen Filamente in der Draufsicht, die Einsätze repräsentieren Übersichtsaufnahmen der Gerüste (oben) und einzelner Filamente (unten). Photographien zeigen den Zustand der Gerüste nach 11.5 d).

Gleichzeitig konnten mit fortschreitendem Abbau Partikel aus der Polymermatrix herausgewaschen werden, was die hydrolytisch angreifbare Oberfläche weiter vergrößerte. Nach ca. 9.5 d begannen in dieser Studie auch die kristallinen Bereiche des PCLs sich aufzulösen. Die Morphologie änderte sich dabei sichtlich. Aus den µm-großen Vertiefungen entstand eine kraterartige Fläche. Dabei lösten sich an einzelnen Stellen die Filamente ab, was zum Verlust von Form und struktureller Integrität in den Waschschritten führte. Erste sichtbare Verformungen zeigten sich in allen Kompositgruppen etwa zur selben Zeit. Gerüste aus reinem PCL hingegen behielten bis zum Ende der Studie ihre Form (Abbildung A8).

Unter den gewählten basischen Bedingungen zeigten die unterschiedlichen Zusammensetzungen der Composite verschieden ausgeprägte Abbauprofile. Im Allgemeinen ist die Zersetzungsgeschwindigkeit maßgeblich von der Füllmenge der anorganischen Additive im Komposit abhängig. Im Speziellen wirkte cMgF<sub>2</sub> im Vergleich zu nHA jedoch stärker auf die Beschleunigung des Abbauprozesses. Wahrscheinlich ist, dass die PCL/Partikel-Grenzfläche auf Grund des wasserlöslichen MBC hydrophiler wurde. Das führte zu einer verstärkten Benetzbarkeit, die wiederum die wässrige Hydrolyse begünstigte. Durch die geschickte Kombination der Füllmaterialien lässt sich also die Abbaugeschwindigkeit der Composite einstellen, was für die Regeneration von verschiedenen Geweben von Vorteil ist. Im Fall von PCL-basierten Materialien für den Knochenersatz ist eine zügigere Zersetzung als bei reinem PCL erwünscht, damit sich die Abbauphase dem Zeitraum des Knochenaufbaus annähert.<sup>[213]</sup>

### 3.2.2.5 Viabilität und Proliferation von mesenchymalen Stammzellen

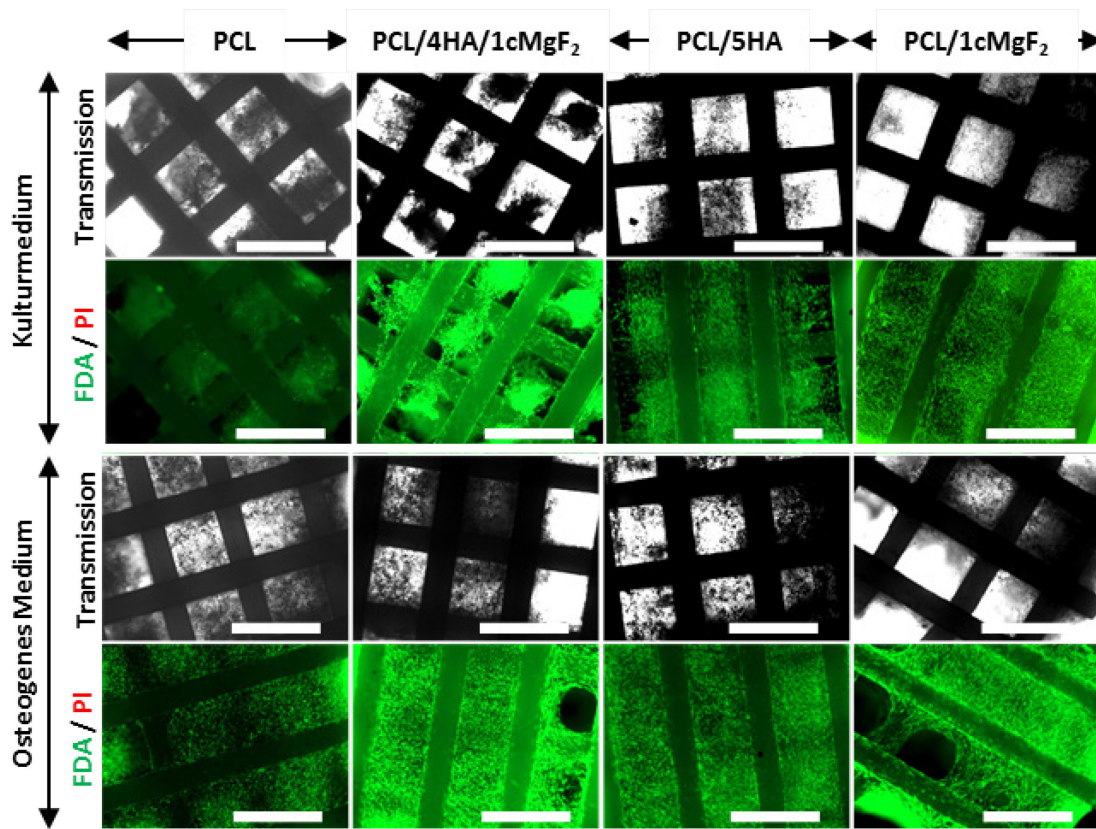
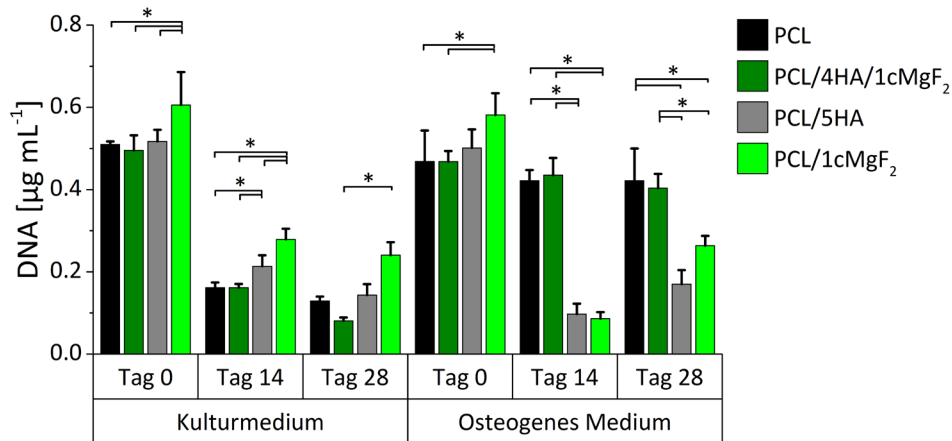


Abbildung 78: Zellviabilität von hMSCs auf 3D-Gerüsten: Die FDA/PI-Anfärbung von Zellen auf PCL, PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub>, PCL/5HA und PCL/1cMgF<sub>2</sub> am Ende der Studie (Tag 28) zeigte nur vitale Zellen (grün) und keine abgestorbenen (rot) (Maßstabsbalken 1 mm, Bedingungen: Inkubation in Kultur- und in osteogenem Induktionsmedium über vier Wochen, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre).

Zur Untersuchung der Biokompatibilität wurden von Akhilandeshwari Ravichandran (Gruppe von Prof. Teoh, NTU) fetale hMSCs mit den Gerüsten aller Kompositgruppen inkubiert. Die Überlebensfähigkeit der Zellen (Viabilität) wurde mit Hilfe eines Vitalfärbeverfahrens basierend auf Fluoresceindiacetat (FDA) und Propidiumiodid (PI) untersucht, die nach Fluoreszenzanregung lebende Zellen in grün bzw. tote Zellen in rot anzeigen. Dazu wurden die mit den Zellen besiedelten Gerüste in Kultur- und in osteogenem Induktionsmedium inkubiert. Die Proben wurden zu drei Zeitpunkten (Tag 0, 14 und 28) untersucht (Abbildung 78 & Abbildung A9 im Detail). Die qualitative Viabilität war ungeachtet der Zusammensetzung der Gerüste in jedem Fall hervorragend. Es konnten zu keinem Zeitpunkt und in keinem der Medien abgestorbene Zellen visualisiert werden (Abbildung A9).



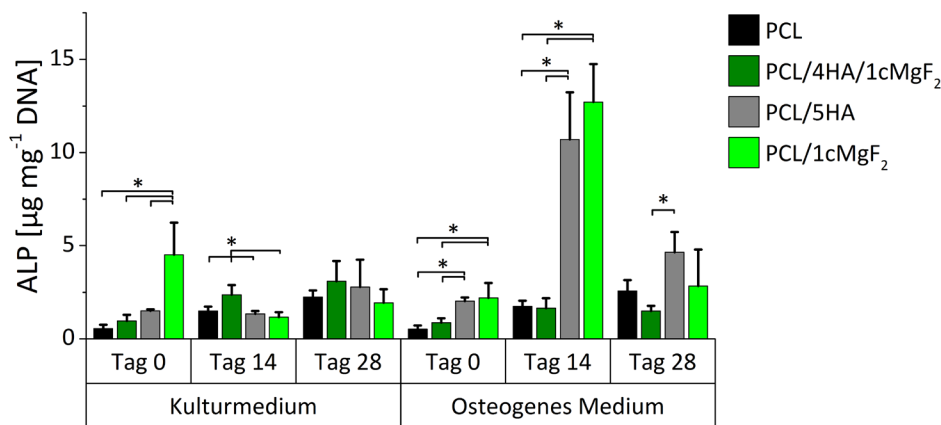
**Abbildung 79: Zellproliferation von hMSCs auf 3D-Gerüsten: DNA-Gehalt im Zelllysate (Bedingungen: Inkubation in Kultur- und in osteogenem Induktionsmedium über vier Wochen, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, (\*) Signifikante Unterschiede,  $p > 0.01$ ).**

Diese gute Zellverträglichkeit konnte durch die Quantifizierung von dsDNA bestätigt werden (Abbildung 79), die ein Maß für die Anzahl der gewachsenen Zellen darstellt. Die anfängliche Absenkung der DNA-Konzentration über die ersten 14 d geht auf den Abbau einer verwendeten Fibrinmatrix zurück. Diese erleichterte zu Beginn die Zellbesiedlung auf den großporigen Gerüsten und führte im Laufe der Zeit zu diesem signifikanten Zellverlust. Der Vergleich der Proben im Kulturmedium wies mit  $(0.61 \pm 0.08) \mu\text{g mL}^{-1}$  signifikant höhere Werte für PCL/1cMgF<sub>2</sub> auf als für alle anderen Gruppen, was sich bis zum Ende der Studie fortsetzte. Im osteogenen Medium war die Situation komplexer. Am Ende der Studie wurden  $(0.42 \pm 0.08) \mu\text{g mL}^{-1}$  und  $(0.40 \pm 0.03) \mu\text{g mL}^{-1}$  dsDNA auf PCL bzw. PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> gefunden. Dies war erheblich mehr als bei den anderen beiden Kompositen PCL/5HA  $((0.17 \pm 0.03) \mu\text{g mL}^{-1})$  und PCL/1cMgF<sub>2</sub>  $((0.26 \pm 0.02) \mu\text{g mL}^{-1})$ . Der Einfluss von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> auf die Proliferation war in beiden Inkubationsmedien größer als der von 5 wt% nHA. Dieser Effekt kann auf veränderte Oberflächeneigenschaften zurückgeführt werden, die aus der Kompatibilisierung resultieren und im vorigen Kapitel bereits diskutiert wurden. Obwohl die cMgF<sub>2</sub>-Partikel nicht auf der Oberfläche exponiert waren, veränderten sich die Eigenschaften wie die Benetzbarkeit mit Wasser und das Oberflächen- $\zeta$ -Potenzial der 3D-gedruckten Strukturen ins Positive für Zellverträglichkeit und die Zellbesiedlung.

### 3.2.2.6 Osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen

Eine detaillierte In-vitro-Studie wurde durchgeführt, um die Fähigkeit des ternären Komposits zu untersuchen, die Differenzierung von humanen mesenchymalen

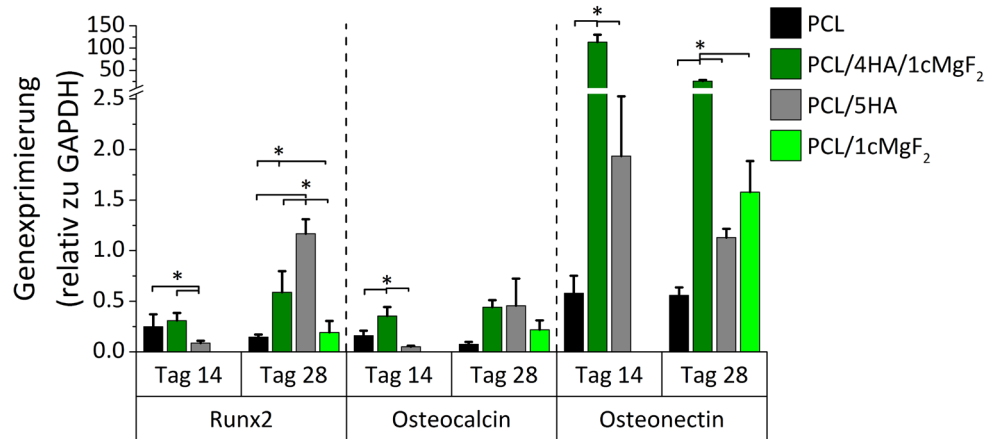
Stammzellen (hMSCs) in am Knochenaufbau beteiligte Zelltypen zu induzieren. Dies ist die Voraussetzung für einen anschließenden Mineralisierungsprozess. Als Maß für die osteogene Differenzierung wurde das Maximum der ALP-Aktivität am Tag 14 quantifiziert (Abbildung 80). ALP markiert das Ende der Proliferationsphase und damit den Beginn der Mineralisationsphase.<sup>[214]</sup> Das Enzym wurde mit  $(11 \pm 3) \mu\text{g mg}^{-1}$  und  $(13 \pm 2) \mu\text{g mg}^{-1}$  am stärksten auf den Systemen PCL/5HA bzw. PCL/1cMgF<sub>2</sub> exprimiert. Selbst bei geringen Mengen wie 1 wt% cMgF<sub>2</sub> wurde die ALP-Produktion angeregt.



**Abbildung 80: Osteogene Aktivität gemessen an der ALP-Expression (normiert auf den DNA-Gehalt, Bedingungen: Inkubation in Kultur- und in osteogenem Induktionsmedium über vier Wochen, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre, (\*) Signifikante Unterschiede,  $p > 0.01$ ).**

Exprimierte Gene wie die des Transkriptionsfaktors *runx-related transcription factor 2* (Runx2), des Osteocalcins und des Osteonectins wurden nach der Zellkultivierung auf den 3D-Gerüsten analysiert, um die In-vitro-Differenzierung noch detaillierter zu verfolgen. Runx2 ist maßgeblich an der osteogenen Differenzierung und der Skelettentwicklung beteiligt.<sup>[215]</sup> Osteocalcin ist neben seiner grenzflächenvermittelnden Wirkung ähnlich wie Osteonectin ein wichtiges Skleroprotein, das den Mineralisierungsprozess von MSCs initiiert und die Kristallisation unterstützt (Abbildung 66). Damit sind beide Proteine Marker für einen fortgeschrittenen Differenzierungszustand bei der Bildung von Knochengewebe.<sup>[216]</sup> Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (engl. *quantitative, real-time polymerase chain reaction*, qPCR)-Analysen zeigten die Anwesenheit der zugehörigen Gene während der Kultivierung bei allen Kompositgruppen (Experimentaltail, Tabelle 4). Damit kann bei allen untersuchten Materialien von einer osteogenen Differenzierung ausgegangen werden (Abbildung 81).





**Abbildung 81: Genexpression von Runx2, Osteocalcin und Osteonectin als Marker für osteoblastische Differenzierung und Knochenmineralisierung gemessen mit Hilfe von qPCR (\* Signifikante Unterschiede,  $p > 0.01$ ).**

Wenn die Zellen auf den Kompositgerüsten anstatt auf reinem PCL gewachsen waren, wurden erhöhte Konzentrationen dieser Gene gemessen. Die Gene wurden relativ zum Gehalt der ebenfalls entstehenden Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) angegeben. GAPDH ist ein Haushaltsgen, das an der Glycolyse beteiligt ist und demnach in allen lebenden Zellen ungeachtet der osteogenen Aktivität exprimiert wird.<sup>[217]</sup> Die Normierung auf das Referenzgen GAPDH reduziert die Varianz der Ergebnisse, weil es experimentelle Einflüsse der Studie sowohl auf das Referenzgen als auch auf die untersuchten Gene gleichermaßen berücksichtigt.<sup>[205a]</sup> Der auffallendste Anstieg wurde für Osteonectin mit  $110 \pm 20$  (relativ zu GAPDH) an Tag 14 und mit  $26 \pm 3$  an Tag 28 auf PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> gefunden. Gefolgt wurde dieses Maximum von PCL/5HA mit  $2.0 \pm 0.6$  (relativ zu GAPDH, Tag 14) und  $1.1 \pm 0.1$  (Tag 28). Die Quantifizierung an Tag 14 auf PCL/1cMgF<sub>2</sub> war nicht zuverlässig möglich, weil die Konzentration an zugehöriger RNA unterhalb der Bestimmungsgrenze lag.

Die Differenzierung der hMSCs wurde außerdem durch die Anfärbung mit Alizarin und nach der von-Kossa-Methode bestätigt. Diese komplementären Methoden zeigen durch die Intensität der Färbung jeweils die Ablagerung von Calcium (rot) bzw. von Phosphatspezies (grau bis schwarz) an (Abbildung 82 A & Abbildung A10 im Detail). Damit wurde ein qualitativer Nachweis der beginnenden Mineralisierung durch die hMSCs bzw. die differenzierten Osteoblasten am Ende der vierwöchigen Studie in osteogenem Induktionsmedium erbracht. Bei beiden Techniken waren mit Ausnahme der von Kossa-Färbung auf PCL/5HA intensivere Färbungen auf den Kompositen als auf reinem PCL zu erkennen.  $\mu$ CT-Scans von Jing Lim (NTU) der Gerüste vor und nach der vierwöchigen Inkubation unterstützten die Ergebnisse, die eine deutliche Mineralisation

besonders auf PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> nachwiesen (Abbildung 82 B). Hierbei sind mineralisierte Bereiche auf Grund ihrer höheren Dichte in weiß dargestellt.

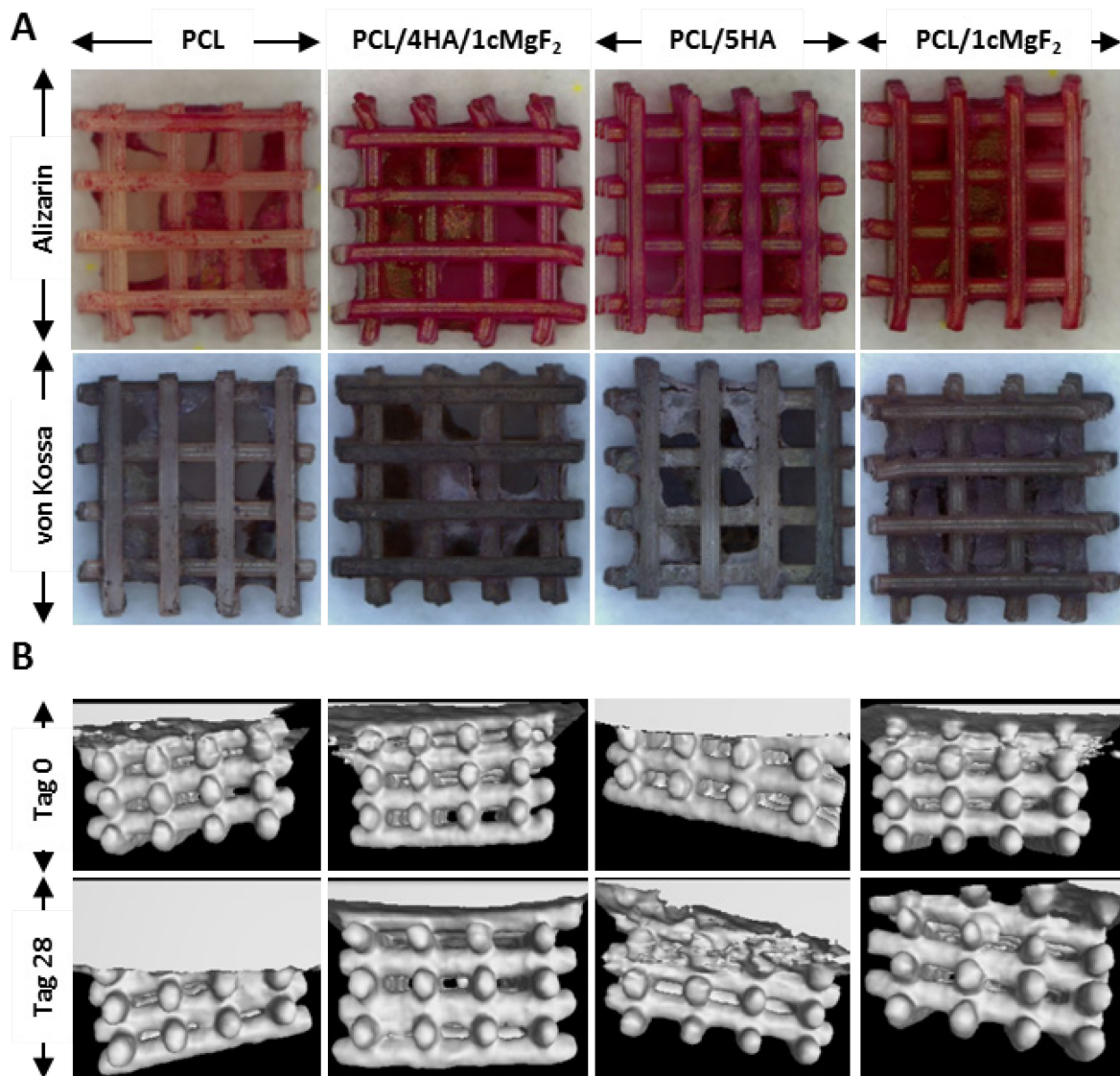
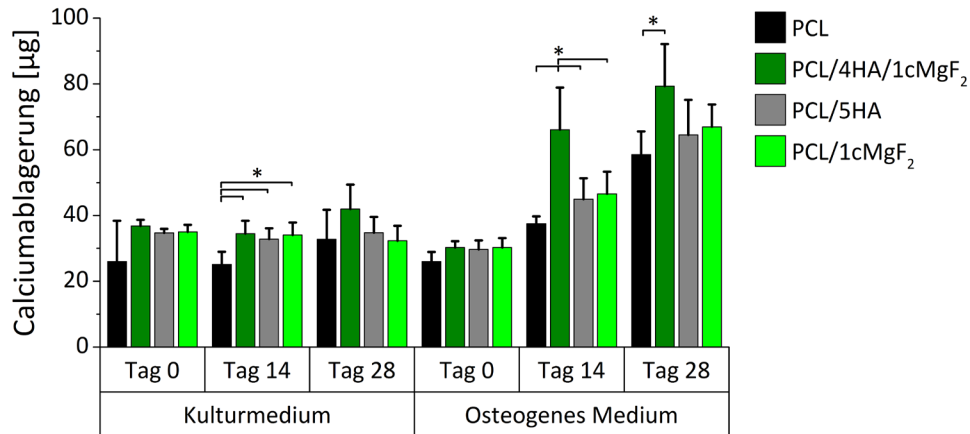


Abbildung 82: Mineralisierung von neugebildetem Gewebe auf den PCL- und Komposit-Gerüsten: (A) Alizarin- und von Kossa-Färbung zeigen Ablagerungen von Calcium (rot) bzw. Phosphatspezies (grau) am Ende der Studie (Tag 28, Kantenlänge der Gerüste ca. 5 mm, Proben nach Abspülen von unspezifisch gebundenen Farbstoffen). (B) µCT-Scans zu Beginn (Tag 0) und am Ende (Tag 28) der In-vitro-Studie (Kantenlänge des Gerüsts ca. 5 mm) (Bedingungen: Inkubation in osteogenem Induktionsmedium über vier Wochen, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre).

Diese qualitativen Beobachtungen konnten anhand der Quantifizierung von abgelagerten Calcium-Spezies auf den Gerüsten noch weiter unterstützt werden (Abbildung 83). Dazu wurden die Gerüste mit Essigsäure gewaschen und die Konzentration der Calcium-Ionen kolorimetrisch bestimmt. Die größten Massen wurden mit  $(70 \pm 10) \mu\text{g}$  an Tag 14 und  $(80 \pm 10) \mu\text{g}$  an Tag 28 auf PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> gefunden.





**Abbildung 83: Mineralisierung von neugebildetem Gewebe auf den PCL- und Komposit-Gerüsten: Quantifizierung Calciumablagerungen durch Abwaschen der Ablagerungen mit Essigsäure und kolorimetrischer  $\text{Ca}^{2+}$ -Bestimmung in Lösung (Bedingungen: Inkubation in osteogenem Induktionsmedium über vier Wochen, 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre, (\*) Signifikante Unterschiede,  $p > 0.01$ ).**

### 3.2.2.7 Teilzusammenfassung

Seit Jahren ist es Ziel der Forschung, die Bioaktivität von inerten Polymeren durch die Einarbeitung von anorganischen, bioaktiven Substanzen wie z. B. Calciumphosphaten zu erhöhen. Veröffentlichungen mit In-vitro- als auch In-vivo-Studien zeigten, dass dadurch eine osteogene Differenzierung erreicht wird.<sup>[200, 218]</sup> Die Resultate dieser Arbeit erlauben ähnliche Rückschlüsse, da besonders die Komposite PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> und PCL/5HA am Ende der vierwöchigen Versuchsphase mineralisiertes Gewebe auf der Polymeroberfläche aufwiesen. Die Beimengung von 1 wt% cMgF<sub>2</sub> alleine war ausreichend, um eine messbare osteogene Differenzierung herbeizuführen. Magnesium wird seit wenigen Jahren immer öfter als potenziell osteogener Faktor untersucht.<sup>[219]</sup> Die Mechanismen hierbei sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt aber Hinweise, dass Magnesium-Ionen in der Lage sind, die Osteogenese von Osteoblasten und MSCs zu stimulieren. Hierbei wird diskutiert, dass sie mit Ionenkanälen oder Integrinen in den Zelloberflächen wechselwirken. In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass bei der Anwesenheit von cMgF<sub>2</sub> mehr Calciumablagerungen als bei den Kompositgruppen vorhanden waren. Dies war beim ternären PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub> signifikant. 1 wt% cMgF<sub>2</sub> ohne weitere nHA-Anteile war nicht ausreichend um signifikante Unterschiede herbeizuführen. Hierzu reichte die lokale Konzentration an freiwerdenden Magnesium-Ionen vermutlich nicht aus. Dafür konnten bei der Expression von an Differenzierung

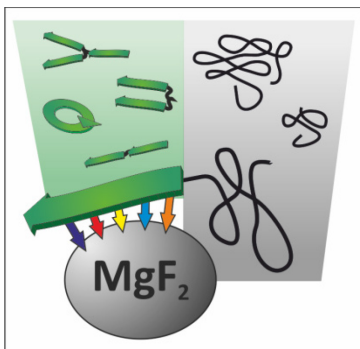
und Mineralisierung beteiligten Genen synergetische Effekte von  $\text{cMgF}_2$  und nHA beobachtet werden.

In dieser Arbeit konnten Kompositmaterialien mit verbesserter mechanischer Stabilität entwickelt werden, die auf eine Verwendung zur Knochenheilung abzielen, aber bei weitem nicht darauf begrenzt sind. Das Projekt konnte von der Idee über die Herstellung bis zur ersten Anwendung realisiert werden. Die Anwendung von kombinatorisch ausgewählten Nanopartikelstabilisatoren wurde auf die Kompatibilisierung von Partikeln in polymeren Hybridmaterialien erweitert, durch lösungsmittelfreie 3D-Druckverfahren verarbeitet und detailliert untersucht. Auch das Potenzial der grenzflächenstabilisierten Materialien für weitergehende biologische In-vivo-Tests wurde durch vielversprechende In-vitro-Studien belegt.

## 4 Zusammenfassung

Für die Entwicklung moderner Hochleistungsmaterialien müssen bisher genutzte, konservative Strategien weiterentwickelt werden. Hierbei wird der Nanotechnologie und der Nachahmung natürlicher Materialien eine besondere Bedeutung beigemessen. In jedem Fall muss für eine effektive Optimierung der Materialeigenschaften die Kontrolle über mehrere Längenskalen verbessert werden. Je komplexer ein Material aufgebaut ist, desto größer ist die Herausforderung diese Kontrolle zu realisieren.

Diese Arbeit stellt einen biokombinatorischen Ansatz vor, bei dem die sequenzspezifischen Wechselwirkungen von Peptiden für die Adhäsion auf anorganischen Oberflächen eingesetzt werden, um Materialien gezielt von der nanoskaligen Ebene an zu modulieren. Im Fokus stand hierbei die Stabilisierung von Nanopartikeln in Lösung und die Grenzflächenstabilisierung der Nanopartikel in polymeren Kompositmaterialien. Die Selektion der Peptid-Binder aus einer kombinatorischen Bibliothek ermöglicht im Gegensatz zu rationalen bzw. wissensbasierten Ansätzen die Entdeckung neuartiger sowie die Weiterentwicklung bestehender Stabilisatoren. Nach der Identifikation potentieller Bindungssequenzen wurden damit Peptid-PEG-Konjugate hergestellt. Sie kombinieren die materialaffine Oberflächenhaftung der ausgewählten Peptid-Domäne mit der Oberflächenmodifizierung durch den PEG-Block.

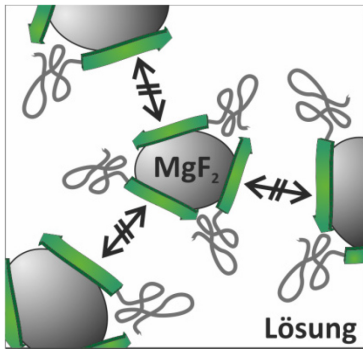


**Abbildung 84:** Schema der Oberflächenbeschichtung von anorganischen Partikeln durch Peptid-PEG-Konjugate variierter Strukturen.

Zur Evaluation der Haftungseigenschaften der peptidischen Spezies wurde mit den Adsorption-Elutionsexperimenten eine Methode verwendet, die die Quantifizierung der Haftmengen auf suspendierten  $\text{MgF}_2$ -Partikeln ermöglicht. Ausgehend vom  $\text{MgF}_2$ -bindenden Konjugat (MBC) wurden die Struktur-Eigenschaftsbeziehungen untersucht (Abbildung 84). Die Variation der Geometrie der Peptid-Segmente und der PEG-Blocklängen zeigte, dass eine effektive Partikel-stabilisierung weniger von der Bindungsaffinität sondern mehr vom Raumbedarf

der Konjugate und der finalen Haftmenge abhängen. Die komplementäre Betrachtung der Oberflächen- und Peptidzusammensetzungen sowie variierte Inkubationsbedingungen ergaben, dass besonders der *N*-terminale Teil von MBC als

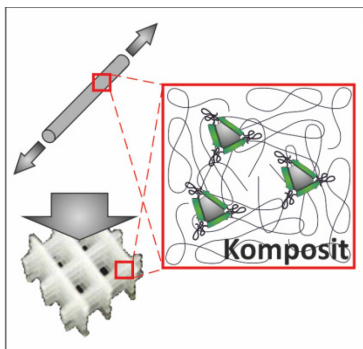
Bindungsdomäne und Lewis-Säure/Base-Wechselwirkungen für die Haftung auf  $\text{MgF}_2$  entscheidend sind.



**Abbildung 85:** Schema der Stabilisierung von  $\text{MgF}_2$ -Nanopartikeln in Lösung durch MBC.

Die  $\text{MgF}_2$ -affinen Bindungseigenschaften von MBC wurden ausgenutzt, um  $\text{MgF}_2$ -Nanopartikel im methanolischen Sol zu beschichten. Die Modifikation der Partikeloberflächen mit den PEG-Konjugaten verhinderte die Ausbildung von Mehrfachschichten und inhibierte die Agglomeration der Nanopartikel (Abbildung 85). Der Vorteil des MBC gegenüber etablierten Partikelstabilisatoren wie TFA zeigte sich beim Eintrocknen der Sole. DLS-,  $^{19}\text{F}$ -NMR, TEM- und AFM-Messungen belegten, dass nur durch MBC

die Sole komplett redispergierbar waren, während TFA-stabilisierte Sole irreversibel agglomerierten. Dabei sind die peptidischen Stabilisatoren im Gegensatz zur TFA bioverträglich.

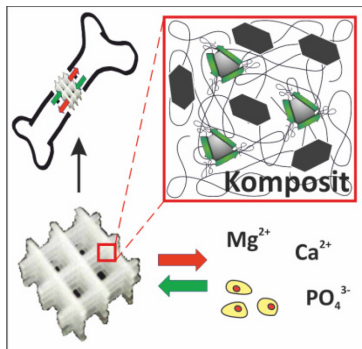


**Abbildung 86:** Schema zur mechanischen Verstärkung in  $\text{PCL}/\text{MgF}_2$ -Kompositen durch die bioinspirierte Grenzflächenstabilisierung durch MBC.

Das Konzept der Nanopartikelstabilisierung in Lösung konnte nach dem Vorbild natürlicher Knochen erfolgreich auf die Kompatibilisierung der Partikel in PCL-Kompositen erweitert werden (Abbildung 86). Dabei erwies sich das materialaffine Peptid-PEG-Konjugat MBC als funktionaler Ersatz für die hochspezifischen, komplex aufgebauten Knochen-Grenzflächenproteine, die für die exzellenten Materialeigenschaften natürlicher Knochen verantwortlich sind. Die hergestellten  $\text{PCL}/\text{MgF}_2$ -Komposite wurden mit Hilfe von 3D-Druckverfahren wie Schmelzschichtung

(FDM) und Schmelzelektrospinnen (MEW) zu hochporösen Gerüsten mit definierten 3D-Strukturen verarbeitet. Die bioinspirierte Grenzflächenstabilisierung verbesserte die Prozessierbarkeit bei den Druckverfahren erheblich. Der mit FDM verarbeitbare  $\text{MgF}_2$ -Anteil in den Kompositen erhöhte sich um das 15-fache und die Verarbeitung durch MEW wurde dadurch überhaupt erst möglich. Die mechanischen Eigenschaften der Komposite wurden durch den Zusatz von kompatibilisiertem  $\text{MgF}_2$  ( $\text{cMgF}_2$ ) signifikant gesteigert. Es konnten simultane Erhöhungen der Steifigkeit bzw. Härte und der Zähigkeit erzielt werden, was in synthetischen Verbundstoffen sonst nur sehr schwierig zu realisieren ist. Die  $\text{PCL}/\text{cMgF}_2$ -Komposite erreichten die mechanischen Eigenschaften von natürlichen, trabekulärem Knochen, wodurch sie sich als Gerüststrukturen für den

Knochenersatz eignen. Verbesserte Oberflächeneigenschaften wie die Benetzbarkeit und das  $\zeta$ -Potenzial sowie eine Biokompatibilität auf dem Niveau von reinem PCL unterstreichen das Potenzial für biomedizinische Anwendungen.



**Abbildung 87:** Schema zur Erhöhung der Bioaktivität der PCL/cMgF<sub>2</sub>-Komposite durch Zugabe von nHA.

Neben den Anforderungen an die Porosität und die mechanische Stabilität von Knochenimplantaten ist die Bioaktivität der Gerüste ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Geweberegeneration. Durch die Zugabe von Hydroxylapatit-Nanopartikeln (nHA) und die Mischung mit Hilfe des Kryomahlens wurden ternäre PCL/nHA/cMgF<sub>2</sub>-Gerüste hergestellt (Abbildung 87), die neben der mechanischen Verstärkung in ausführlichen In-vitro-Zellstudien eine erhöhte Bioaktivität aufwiesen. Bereits geringe Mengen cMgF<sub>2</sub> in PCL lösten selbst in Abwesenheit von nHA die osteogene Differenzierung der Stammzellen aus. Die ternären Komposite zeigten die besten Resultate bei der Knochenregeneration. Hier wurden synergetische Effekte durch die Zugabe von nHA und cMgF<sub>2</sub> festgestellt, die sich in einer verbesserten, osteogenen Differenzierung und einer Mineralisierung von neuem Knochengewebe äußerten.

Das Konzept zur Grenzflächenstabilisierung durch kombinatorisch selektierte, oberflächenbindende Peptid-Polymer-Konjugate hat sich für Nanopartikel sowohl in Lösung als auch in Polymermaterialien als erfolgreich erwiesen. Die Kombination aus materialaffiner Bindung und funktionaler Oberflächenmodifikation stabilisiert die Partikel und verbessert die Wechselwirkungen mit ihrer Umgebung. Bei der Übertragung natürlicher Konzepte auf synthetische Materialien ist die Kontrolle über die innere Struktur ein entscheidender Faktor. Diese kann durch die gezielte Modifikation der Grenzflächen mit den Konjugaten, die selbst bestimmte Funktionen hochspezialisierter Proteine übernehmen können, bereits auf molekularer Ebene umgesetzt werden. Damit schaffen die Biokonjugate die Verbindung zwischen natürlichen und synthetischen Materialien und ermöglichen die Erschließung künstlicher Hybridmaterialien, die in ihrer Stabilität und ihrer Funktionalität zu natürlichen Biomaterialien aufschließen können.



## 5 Ausblick

Die vorliegende Arbeit demonstriert das Potenzial der Grenzflächenstabilisierung am Beispiel von peptidbasierten Bindern und  $\text{MgF}_2$  in verschiedenen chemischen Umgebungen. Die weitere Eingrenzung entscheidender Bindungsmotive könnte bspw. mit NMR-basierten Techniken vertieft werden. Insgesamt ist der Ansatz beginnend bei der kombinatorischen Auswahl der materialelektiven Binder auf ein wesentlich breiteres Spektrum anorganischer Oberflächen anwendbar. Auch die Eigenschaften organischer Oberflächen ließen sich in ähnlicher Weise einstellen. Aus praktischer Sicht kommt jedes Material in Frage, das unter wässrigen, physiologischen Bedingungen stabil ist und dadurch mit Hilfe des Phagen-Displays gescreent werden kann. Dies bietet sich besonders an, wenn keine selektiven oder kovalenten Bindungen zu den Oberflächen gewollt oder möglich sind. Außerdem können auf Grund der selbstorganisierten Adhäsion der Peptide gezielt verschiedene Oberflächen in einem Multikomponentensystem adressiert werden.

Auch die Oberflächenmodifikation, für die hier PEG verwendet wurde, ist ein erweiterbares Konzept. Es können andere synthetische Polymer-Blöcke für die Konjugate verwendet werden. Im naheliegensten Fall kann der Einfluss eines Peptid-PCL-Konjugats auf die Eigenschaften von PCL/ $\text{MgF}_2$ -Kompositen untersucht werden. Neben der Art des Polymers kann außerdem dessen Architektur angepasst werden. Dendrimere wie sternförmiges star-PEG könnten bspw. gut für die Abschirmung von Oberflächen geeignet sein.

Im Hinblick auf die Anwendung grenzflächenstabilisierter Komposite für die biomedizinische Knochenregeneration wäre die Untersuchung der Gerüste in tragenden Anwendungen in vivo der nächste Schritt. Dabei sind vorwiegend die Biokompatibilität und die Fähigkeit zur Unterstützung des Knochenwachstums von Interesse. Auch die tatsächliche Abbauphase unter physiologischen Bedingungen muss für einen erfolgversprechenden Einsatz evaluiert werden.

In Zukunft wird besonders die Kombination aus dem biomedizinisch kompatiblen 3D-Druck und der Gewebezüchtung in Bioreaktoren intensiv untersucht werden. Die in dieser Arbeit identifizierten, synergetischen Effekte der Kombination aus nHA und  $\text{cMgF}_2$  können sich hierbei als sehr hilfreich erweisen. Auch die verbesserte Verarbeitbarkeit mit extrusionsbasierten Druckverfahren eröffnet Möglichkeiten zum Einsatz bisher nicht zugänglicher, bioaktiver Füllpartikel.





## 6 Experimentalteil

### 6.1 Materialien

Alle Materialien wurden ohne weitere Aufreinigung verwendet, sofern es nicht anders beschrieben ist.

**Tabelle E1: Auflistung der verwendeten Chemikalien und Materialien.**

Chemikalien/Materialien	Hersteller/Anbieter
Acetonitril, 99.90%, <i>LC-MS grade</i>	VWR International (Darmstadt, GER)
Ameisensäure, <i>Fluka</i> ®, für MS, ~98%	Sigma-Aldrich (Steinheim, GER)
Aminosäuren:	
Fmoc-AA-OH	Novabiochem® (Darmstadt, GER) und IRIS Biotech (Markredwitz, GER)
Acetanhydrid, ≥99 %	Carl Roth (Karlsruhe, GER)
AgNO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich
Calcium Assay-Kit	BioAssay Systems (Hayward, CA, USA)
CaCl <sub>2</sub>	Sigma (Steinheim, GER)
CFX Connect™	Bio-Rad (SGP)
Kollagenase	Sigma-Aldrich
TMSBr	Iris Biotech
Carboxyfluorescein (Fam), <i>bioreagent grade</i>	Sigma-Aldrich
α-Cyano-4-hydroxymimtsäure (engl. <i>α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid</i> , αCHCA), 99%	Sigma-Aldrich
DCM, <i>peptide grade</i> (über CaH <sub>2</sub> getrocknet, destilliert)	Iris Biotech
Dexamethason	Sigma-Aldrich
2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB), 99%	Acros Organics (Geel, BEL)
DIPEA, <i>peptide grade</i> (vor Gebrauch destilliert)	Acros Organics
FDA/PI-Kit	Life Technologies (SGP)

Fluorwasserstoff, >99%	Solvay Fluor (Hannover, GER)
Fmoc-Rink Amid AM Polystyren-Harz: Beladung: 0.63 mmol g <sup>-1</sup> <sup>(1)</sup>	IRIS Biotech
Gdn · HCl, 99.5%	Carl Roth
β-Glycerophosphat	Sigma-Aldrich
HBTU	IRIS Biotech
HOBt	IRIS Biotech
Hydrazin-Monohydrat	Sigma-Aldrich
Methanol:	
für MgF <sub>2</sub> -Synthese: ≥99.6% (nach Standardverfahren getrocknet, über Molsieb aufbewahrt)	Sigma
für andere Zwecke: <i>LC-MS grade</i>	Acros Organics
MEM, Mg-frei	Corning (NY, USA)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Mg Hackspäne, 99.98%	Aldrich (Steinheim, GER)
NaCl	J. T. Baker (München, GER)
Na-Diethyldithiocarbaminat-Trihydrat	Acros Organics
NaN <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
NMM, 99%	Acros Organics
NMP, 99.9+%, <i>peptide grade</i> (filtriert)	IRIS Biotech
PEG8000	Acros Organics
PicoGreen:	
Kapitel 3.2.1: P11496, Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific (Scoresby, AUS)
Kapitel 3.2.2: Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA)
Piperidin, <i>peptide grade</i> (über Kaliumhydroxid getrocknet, destilliert)	Acros Organics
Proteinase K, Invitrogen™	Thermo Fisher Scientific
PyAOP	Applied Biosystems (Carlsbad, CA, USA)

<sup>(1)</sup> Bei unreinen Syntheseprodukten wurde die Beladung des Harzes durch den Einsatz einer entsprechenden *tert*-Butyloxycarbonyl-geschützten Aminosäure auf 0.25 mmol g<sup>-1</sup> reduziert.

PyBOP	IRIS Biotech
iQ <sup>TM</sup> SYBR <sup>®</sup> Green Supermix	Bio-Rad
RLT-Puffer	QIAGEN (SGP)
SensoLyte <sup>TM</sup> pNPP ALP-Kit	AnaSpec (Fremont, CA, USA)
SIGMAFAST <sup>TM</sup> -Assay	Sigma-Aldrich
Spectra/Por Biotech Dialysemembran: MWCO 100-500 (Celluloseester) MWCO > 1000 (Regenerierte Cellulose) MWCO > 2000 (Regenerierte Cellulose)	Carl Roth
TCEP-Hydrochlorid, >98%	Carl Roth
TentaGel <sup>®</sup> PAP Harze: Beladung: 0.24 mmol g <sup>-1</sup> , M <sub>n</sub> = 3200 Beladung: 0.54 mmol g <sup>-1</sup> , M <sub>w</sub> = 850 Beladung: 0.17 mmol g <sup>-1</sup> , M <sub>w</sub> = 5200	Rapp Polymere (Tübingen, GER)
TES, 98+%	Alfa Aesar (Karlsruhe, GER)
Tetrahydrofuran, technical grade (destilliert)	STOCKMEIER
TFA, <i>peptide grade</i> (destilliert)	Acros Organics
TFA-d, 99.5atom% D	Acros Organics
Triethylsilan (TES), 98+%	Alfa Aesar
Trypsin	Sigma-Aldrich
Wasser	deionisiertes Wasser aus einer Merck Millipore (Darmstadt, GER) Milli-Q <sup>®</sup> Reinstwasseranlage

## 6.2 Methoden

### 6.2.1 Additive Fertigung / 3D-Druck

#### a) FDM

Die 3D-Gerüststrukturen wurden mit einem individuell gefertigten Bioextruder hergestellt (Gruppe von Prof. Hutmacher, QUT/IHBI).<sup>[220]</sup> Dabei wurden die Rohmaterialien in ein beheiztes Reservoir überführt, das auf 120 °C temperiert war. Die Schmelze wurde durch Druckluft zu einem kurzen Einschneckenextruder transportiert. Mit einer Druckgeschwindigkeit von 250  $\mu\text{L min}^{-1}$  und einer Kollektorgeschwindigkeit von 0.3  $\text{m min}^{-1}$  wurde das CAD-gesteuerte Muster durch eine schichtweise, additive Fertigung durch eine 23G-Düse ( $\pm 0.34$  mm Innendurchmesser) extrudiert.

Für die Gerüste aus Kapitel 3.2.1 wurden Strukturen mit den Außenmaßen 40 mm x 40 mm x 2.7 mm mit einem 0°-90° Ablagemuster gedruckt, welche in kleine Teile von 4 mm x 4 mm x 2.7 mm geteilt und für weitere Untersuchungen verwendet wurden. Außerdem wurden flache, einlagige Strukturen mit 1 cm x 0.5 cm aus bündigen Filamenten hergestellt, die für Kontaktwinkel- und Oberflächen- $\zeta$ -Potenzialmessungen nötig waren. Für die Zugversuche wurden einzelne Filamente mit gleichen Druckparametern wie die 3D-Strukturen in 2 cm Länge präpariert.

In Kapitel 3.2.2 wurden die 3D-Gerüste analog zum vorigen Kapitel mit den Außenmaßen 45 mm x 45 mm hergestellt, bevor sie wieder in kleinere, quadratische Teile (4.0 mm x 4.0 mm x 2.7 mm) geschnitten wurden. Vor den In-vitro-Untersuchungen wurde deren Oberflächen für 30 min mit 5 M  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$  angeätzt. Auch die Einzelfilamente wurden analog zum vorigen Kapitel prozessiert.

#### b) MEW

Die faserigen Netzwerke für Kapitel 3.2.1 wurden an einem individuell gefertigten Schmelzelektrospinngerät mit einer Hochspannungsquelle *DX250R* (EMCO, Hallein, AUT) und einem *Digit Multimeter 2100* (Keithley, Cleveland, OH, USA) hergestellt (Gruppe von Prof. Groll, FMZ Universität Würzburg).<sup>[221]</sup> Per Druckluft (2 bar) wurden die Schmelzen bei 120 °C, 10-12 kV Beschleunigungsspannung sowie 1.5 cm Abstand zum Kollektor durch eine 23G-Nadel extrudiert und auf einem geerdeten, in x,y-Richtung beweglichen Aluminium-Kollektor gesammelt. Die Druckparameter wurden für einen kontinuierlichen Druck von purem PCL optimiert, um ein Pulsieren (engl.

*pulsing*) des Jets bzw. eine Fluktuation der Faserdicke (engl. *beading*) zu vermeiden.<sup>[222]</sup> Zur Demonstration der Druckbarkeit wurden Muster mit den Außenmaßen (10 x 10) cm<sup>2</sup> und Porenweiten von (1 x 1) mm<sup>2</sup> nach G-Code-Software (MACH 3 CNS-Software, ARTSOFT, Livermore Falls, ME, USA) gedruckt.

### 6.2.2 Adsorption-Elutionsexperimente

1 mL der Lösung der fam-markierten Peptide und Peptid-Polymer-Konjugate wurden als Stammlösung angegebener Konzentrationen mit 10 mg der fraktionierten MgF<sub>2</sub>-Xerogelpartikel für 4 h (wenn nicht anders beschrieben) bei RT unter Schütteln inkubiert. Die fluoreszierende Suspension wurde zentrifugiert (16 000 rpm, 10 min), der Überstand abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Für die fluoreszenzbasierte Konzentrationsbestimmung wurde die Lösung erneut zentrifugiert, um eventuelle Partikel zu entfernen. Ein geringes Volumen wurde entsprechend einer vorherigen Kalibration vor der Fluoreszenzmessung verdünnt. Bei jedem Waschschrift wurden die abzentrifugierten Partikel in 1 mL Wasser redispergiert, erneut zentrifugiert und analog vermessen. Die Messung erfolgte an einem *Synergy MX Microplate* Fluoreszenzspektrometer (BioTek, Bad Friedrichshall, GER) in schwarzen 96-Well-Platten (Anregungswellenlänge  $\lambda_{\text{ex}} = 495$  nm, Emissionswellenlänge  $\lambda_{\text{em}} = 517$  nm, konstanter *gain* innerhalb einer Messreihe).

### 6.2.3 Berechnung des hydrodynamischen Radius von MBC

Ausgehend von der Bildung von statistischen Knäueln von Polymeren in Lösung wurde der hydrodynamische Radius  $R_h$  mit Hilfe von Abschätzungen über den Streumassenradius  $R_g$  (auch Gyrationradius) berechnet. Dieser kann mit der Zahl der Wiederholungseinheiten  $N$  und deren effektiver Monomerlänge  $L$ , welche sowohl für Ethylenglycol- wie auch für Aminosäure-Einheiten als 0.35 nm angenähert wird, berechnet werden (Gleichung 3).<sup>[97a, 223]</sup>

$$R_g^2 = \frac{1}{6} N L^2 \quad (\text{Gleichung 3})$$

$$\frac{R_g}{R_h} \approx 1.65 \quad (\text{Gleichung 4})$$

Das Verhältnis  $R_g/R_h$  liegt für ein statistisches Knäuel in der Regel zwischen 1.5 und 1.8 (Gleichung 4), wobei der Mittelwert von 1.65 angenommen wurde.<sup>[224]</sup> Damit berechnet sich der hydrodynamische Durchmesser  $D_h$  als Doppeltes vom  $R_h$  für MBC (Pep<sub>14mer</sub>-

PEG<sub>72</sub>) zu 1.61 nm. Hierbei werden Struktur-Eigenschaftsbeziehungen und Rotationswinkel des Peptid-Segments vernachlässigt.

## 6.2.4 Berechnung der Oberflächenbelegung

Die Oberflächenbelegung  $\theta$  ist der Quotient aus der Fläche  $A_{\text{Konjugat}}$ , die die Peptide nominell auf der Oberfläche einnehmen, und der Fläche  $A_{\text{MgF}_2}$ , die das Substrat anbietet (Gleichung 5).

$$\theta = \frac{A_{\text{Konjugat}}}{A_{\text{MgF}_2}} = \frac{n_{\text{Haft}} N_A A_{\text{Konjugat}}}{S_m} \quad (\text{Gleichung 5})$$

Zur Berechnung werden die molare spezifische Haftmenge  $n_{\text{Haft}}$ , die Avogadro-Konstante  $N_A$ , die Fläche  $A_{\text{Konjugat}}$  und die massenbezogene, spezifische Oberfläche des Substrats  $S_m$  benötigt. Als Haftmenge wurde die stabile Menge von 24  $\mu\text{mol g}^{-1}$  von MBC bei der höchsten Konzentration von 0.5 mM verwendet, während der Platzbedarf einzelner Konjugate  $A_{\text{Konjugat}}$  als Kreisfläche

$$A_{\text{Konjugat}} = \pi R_h^2 \quad (\text{Gleichung 6})$$

ausgehend von  $R_g$  nach Gleichung 3 und Gleichung 4 wie bereits beschrieben angenähert wurde (Gleichung 6). Die Oberfläche  $S_m$  der  $\text{MgF}_2$ -Xerogelpartikel basiert auf der gemessenen BET-Oberfläche ( $160 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ), die über die Zugänglichkeit der Poren für MBC korrigiert wurde ( $56 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , Abbildung 37).

## 6.2.5 Beschleunigte Abbaustudien

Der hydrolytische Abbau der PCL-basierten 3D-verdruckten Materialien in wässrigen Medien wurde nach etablierten Protokollen von Lam et al. beschleunigt, um die relative Abbaugeschwindigkeiten der Komposite in einem kürzeren Zeitraum zu untersuchen.<sup>[200]</sup> Die geschnittenen Gerüste wurden dazu in 5 M  $\text{NaOH}_{\text{aq}}$  bei 37 °C inkubiert. Zur gravimetrischen (elektronische Waage mit 0.1 mg-Auflösung) und morphologischen (Olympus Digitalkamera und *TM-3000* SEM (Hitachi, Tokyo, JPN) in Kapitel 3.1.2; *Jeol JSM-6060* (Jeol, Eching, GER) in Kapitel 3.2.1, QUT/IHBI) Untersuchung wurden die Proben zu jedem Zeitpunkt intensiv mit Wasser gewaschen und für 24 h bei vermindertem Druck getrocknet.

## 6.2.6 BET-Messungen

Die spezifischen Oberflächen wurden anhand von Stickstoff-Adsorption/Desorptionsmessungen bei 77 K an einem *Micromeritics ASAP 2020*

(Aachen, GER) gemessen und nach dem BET-Modell berechnet (Gruppe von Dr. Emmerling, BAM). Porenweiten wurden aus der statistischen Schichtdicke des t-Plots nach Harkins und Jura berechnet.<sup>[167]</sup>

## 6.2.7 Chromatographie

### a) Analytische Flüssigphasenchromatographie (UPLC)

Analytische Messungen erfolgten an einem *ACQUITY-UPLC® H-Class CM Core*-System (Waters GmbH, Eschborn, GER) ausgerüstet mit einem *ACQUITY-UPLC®* Photodiodenarray-Detektor (190-800 nm) und einem *ACQUITY-UPLC® QDa*-Massendetektor. Zum Einsatz kamen eine *ACQUITY-UPLC® BEH C18*-Säule (110 Å, 1.7 µm, 50 × 2.1 mm Waters) und eine *ACQUITY-UPLC® BEH C18 VanGuard™*-Vorsäule (110 Å, 1.7 µm, 5 × 2.1 mm, Waters). Die mobile Phase war ein Gemisch aus Wasser/0.1% Ameisensäure (v/v, Lösung A) und Acetonitril/0.1% Ameisensäure (v/v, Lösung B), das in linearen Gradienten über 4 min bei 40 °C und 0.5 mL min<sup>-1</sup> verwendet wurde.

### b) Fast protein liquid chromatography (FPLC)

Die Aufreinigung und Entsalzung der Peptid-Polymer-Konjugate geschah nach dem Prinzip der Größenausschlusschromatographie an einer ÄKTA Prime plus (GE Healthcare Europe, Freiburg, GER) nach vorheriger Filtration (Nylon, 0.45 µm) über in Reihe geschaltete *Sephadex® HiTrap*-Säulen mit einem 0.5 mL min<sup>-1</sup> Wasserstrom.

### c) Größenausschlusschromatographie (SEC)

Die Trennung per Größenausschluss erfolgte über drei WGE Dr. Bures Säulen (300 × 8 mm SDV-Säulen (50 Å, 5 µm; 500 Å, 5 µm; 1000 Å, 5 µm), Dallgow-Döberitz, GER) mit 1.0 mL min<sup>-1</sup> Tetrahydrofuran als mobile Phase. Die Detektion erfolgte an einem *Knauer K2301* Brechungsindex-Detektor und einem *Knauer Smartline 2500* UV-Detektor (beide Knauer, Berlin, GER) im Vergleich zu einer Kalibration mit Polystyren-Standards (Kit S-L-10 LOT 79) und gegen 2,4-Di-*tert*-butyl-4-methoxyphenol als internen Standard (Gruppe von Prof. Hecht, HUB).

## d) Präparative Flüssigphasenchromatographie (prep-HPLC)

Für die (semi)präparative Aufreinigung von Peptiden wurde ein Shimadzu-System (Shimadzu Deutschland GmbH, Duisburg, GER) mit einem *CBM-20A*-Controller, einem *DGU-14A-Online*-Entgaser, einer *LC-20AP*-Pumpe, einem *SIL-20AHT*-Autosampler, einem *FRC-10A*-Fraktionssammler und einem dualen SPD-10Avp UV/Vis-Detektor (Monitoring bei 210 nm) verwendet. Die Trennung erfolgte durch eine *Synergy™ Fusion-RP*-Säule (80 Å, 4 µm, 250 × 21.20 mm, Phenomenex®, Aschaffenburg, GER) mit vorgeschalteter SecurityGuard™ PREP-Kartusche (Fusion-RP 15 × 21.20 mm, Phenomenex®) bei einer Flussrate von 22.0 mL min<sup>-1</sup> einer Mischung aus Wasser/0.1% Ameisensäure (v/v, Lösung A) und Acetonitril/0.1% Ameisensäure (v/v, Lösung B) bei RT. Für die Aufreinigung der Peptide für die SMFS wurde ein linearer Gradient von 5-50% B in A über 30 min gewählt.

### 6.2.8 Dialyse

Die Proben wurden in möglichst wenig Wasser gelöst. Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH<sub>aq</sub> und 1 M HCl<sub>aq</sub> neutral eingestellt. Es wurde ca. 1% (m/v) Guanidiniumhydrochlorid (Gdn · HCl) zugegeben, bevor die Mischung in Dialyseschläuche überführt und 2-4 d gegen Wasser dialysiert wurde bis eine Leitfähigkeit von < 2 µS cm<sup>-1</sup> erreicht war. Das Dialysemedium wurde 2-3 Mal pro Tag ausgetauscht.

### 6.2.9 Dynamische Lichtstreuung (DLS) und (Oberflächen-)ζ-Potenzial

DLS und ζ-Potenzial-Messungen erfolgten an einem *Zetasizer Nano ZSP* (Malvern Instruments, Herrenberg, GER) in Einweg-Polystyrenküvetten bzw. in Einweg-Zetapotentialküvetten (Malvern Instruments; Gruppe von Prof. Kemnitz, HUB). Die Küvetten wurden mit Hilfe von Druckluft von Staub und Partikeln befreit. Die Proben wurden teilweise (sofern erwähnt) filtriert (Nylon-Spritzenfilter, Porenweite 0.45 µm). Im Falle der TFA-stabilisierten und nicht-stabilisierten Sole (Kapitel 3.1.2) mussten die Proben filtriert werden, weil Agglomerate im µm-Bereich vorhanden waren. Diese sind in Abbildung 41 (B) gezeigt. Oberflächen-ζ-Potenziale wurden mit Hilfe einer entsprechenden Erweiterung des *ZetaSizers Nano ZSP* durchgeführt.



### 6.2.10 Dynamische Differenzkalorimetrie (DSC)

Thermische Messungen wurde je nach Messreihe entweder an einem *Mettler Toledo 821e* (Mettler Toledo, Gießen, GER) oder an einem *DSC 8000* (PerkinElmer, Berlin, GER) durchgeführt (Gruppe von Prof. Hecht, HUB). Dabei wurden 40 µL Aluminiumpfännchen und Heiz-/Kühlraten von 10 °C s<sup>-1</sup> zwischen -65 bis 120 °C (Kapitel 3.1.2) bzw. zwischen 0 bis 120 °C verwendet. Dabei wurden Temperaturplateaus an den jeweiligen Extremtemperaturen für je 5 min gehalten. Die Kristallinitätsgrade  $X_C$  wurden nach Gleichung 7 berechnet,

$$X_C = \Delta H_f * \%_{PCL}^{-1} * \Delta H_f^{\circ -1} \quad \text{(Gleichung 7)}$$

wobei  $\Delta H_f$  und  $\Delta H_f^{\circ}$  die gemessene (normiert auf den prozentualen PCL-Anteil  $\%_{PCL}$ ) bzw. die Standard-Schmelzenthalpie (136 J g<sup>-1</sup>) sind.<sup>[190, 225]</sup>

### 6.2.11 Elementaranalyse / CHN-Analyse

Die elementare Zusammensetzung des PCLs und der Komposite wurden an einem *Leco CHNS-923*-Analysator (St. Joseph, MI, USA) untersucht. Gemessen wurden Kohlenstoff-, Wasserstoff- und Stickstoff-Gehalte. Andere Anteile wurden wie im Ergebnisteil beschrieben ausgehend von der Summenformel reinen PCLs berechnet. Massengehalte  $\omega(\text{MgF}_2)$  wurden aus der Differenz der theoretischen Massenanteile ausgehend von der Summenformel  $(\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_2)_n$  und den gemessenen Anteilen berechnet. Sauerstoffanteile wurden dabei basierend auf dem Anteil  $\omega(\text{C})$  ausgerechnet.

### 6.2.12 In-vitro-Studien

#### a) Zellstudien in Kapitel 3.2.1

Im Abschnitt 3.2.1 wurde mit placentalen hMSCs gearbeitet (Dr. Vaquette, Gruppe von Prof. Hutmacher, QUT/IHBI). Diese wurden bis zur siebten Passage in alpha-modifiziertem MEM ( $\alpha$ -MEM) angereichert mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin (D10-1) kultiviert.

**1) Zellbesiedlung:** hMSCs (50 000 Zellen in 30 µL Medium) wurden auf den FDM-gedruckten Gerüsten aus 1 wt% cMgF<sub>2</sub> (Testgruppe) und PCL (Kontrollgruppe) angesiedelt und für 4 h bei 37 °C in einer 5%igen CO<sub>2</sub>-Atmosphäre gehalten bevor das Medium zugegeben wurde. Die 3D-Strukturen wurden danach für 2, 4 bzw. 10 Wochen

in osteogenem Medium (D10-1 mit  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  Ascorbat-2-phosphat,  $10 \text{ mM}$   $\beta$ -Glycerophosphat,  $0.1 \mu\text{M}$  Dexamethason) kultiviert.

**2) DNA-Quantifizierung/Proliferation:** Der DNA-Gehalt wurde nach 2, 4 und 10 Wochen nach der Zellbesiedlung gemessen ( $n = 6$ ). Überstehendes Medium wurde entfernt, bevor die inkubierten Proben für mindestens 48 h bei  $-80^\circ\text{C}$  eingefroren wurden. Danach wurden die Gerüste in  $300 \mu\text{L}$  Proteinase K (in phosphatgepufferter Ethylendiamintetraacetat-Lösung  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ ) überführt und für 12 h bei  $60^\circ\text{C}$  gelagert. Die Lösung wurde 15-fach mit phosphatgepuffertem Ethylendiamintetraacetat verdünnt.  $100 \mu\text{L}$  der Lösung wurden für eine Dreifachbestimmung in schwarze 96-Well-Platten überführt und  $100 \mu\text{L}$  PicoGreen-Arbeitslösung hinzugefügt. Nach 5 min Inkubationszeit unter Lichtausschluss wurde die Fluoreszenz ( $\lambda_{\text{ex}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) quantifiziert. Kalibriert wurde mit bekannten Konzentrationen von  $\lambda$ -DNA zwischen  $10 \text{ ng mL}^{-1}$  und  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**3) ALP-Aktivität:** Die ALP-Aktivität wurde in Dreifachbestimmungen nach 2, 4 und 10 Wochen (nach je 24 h) bestimmt. Dazu wurden die Proben für 5 min in *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) ohne Phenolrot eingelegt. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt. Die Gerüste wurden in 24-Well-Platten überführt. Es wurden  $600 \mu\text{L}$  des Mediums hinzugegeben und die Proben für genau 24 h inkubiert. Mit einem SIGMAFAST™-Assay wurde ALP quantifiziert. Nach der Anleitung des Herstellers wurden  $100 \mu\text{L}$  *p*-Nitrophenylphosphat in Tris-basischem Puffer zu  $100 \mu\text{L}$  Kulturmedium in einer 96-Well-Platte gegeben und für 24 h bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\% \text{ CO}_2$  inkubiert. Am Ende der zweiten Inkubation wurde die Platte für 5 min bei RT abgekühlt, bevor die Extinktion an einem *Benchmark Plus™ Plate Reader* Spektrometer (BIO RAD, Gladesville, AUS) bei  $405 \text{ nm}$  gemessen. Die ALP-Menge wurde auf den zuvor gemessenen DNA-Gehalt normiert.

## b) Zellstudien in Kapitel 3.2.2

Für die weiterführende In-vitro-Studie zur Untersuchung des osteogenen Potenzials wurden fetale hMSCs eingesetzt (Dr. Lim, Gruppe von Prof. Teoh, NTU).<sup>[226]</sup> Diese wurden vom *Domain Specific Review Board of National Healthcare Group* (DSRB-D-06-154)<sup>[227]</sup> genehmigt, in Übereinstimmung mit internationalen Richtlinien und wie bereits zuvor beschrieben isoliert.<sup>[228]</sup>

**1) Zellbesiedlung:** Die Gerüste wurden mit einer Zell-Dichte von  $3\,000$  Zellen pro  $\text{mm}^{-3}$  Gerüstvolumen besiedelt und für 28 d entweder im Kulturmedium (DMEM

138

angereichert mit 10% (v/v) fetalem Kälberserum (D10-2) und 1% (v/v) Penicillin/Streptomycin) oder in osteogenem Medium (D10-2 mit 0.2 mM Ascorbinsäure, 10 mM  $\beta$ -Glycerophosphat, 0.01  $\mu$ M Dexamethason, vor Benutzung steril filtriert) kultiviert.

**2) DNA-Quantifizierung/Proliferation und Vitalfärbeverfahren (Live/Dead-Verfahren):** Die extrazelluläre Matrix wurde durch die Inkubation der Gerüste in PBS (engl. *phosphate buffered saline*)-Puffer angereichert mit 1 mg mL<sup>-1</sup> Kollagenase und 0.1% (v/v) Trypsin für 2 h verdaut. Die Zellen wurden mit Hilfe von Frier/Tau-Zyklen lysiert. Die DNA wurde wie im vorigen Absatz beschrieben mit einem PicoGreen-Kit fluoreszenzspektroskopisch quantifiziert. Außerdem wurde die Zellviabilität an einem *Olympus LX71* Fluoreszenzmikroskop (Olympus Optical, Tokyo JPN) nach der Markierung mittels FDA/PI visualisiert. Dadurch konnten vitale Zellen in grün und abgestorbene Zellen in rot dargestellt werden.

**3) ALP-Aktivität:** Hierfür wurden die Zellysate mit einem SensoLyte™ pNPP ALP-Kit nach den Herstellervorgaben auf die ALP-Aktivität untersucht. Auch hier wurden die Ergebnisse auf die zuvor bestimmten DNA-Gehalte normiert.

**4) Gen-Expression:** Die exprimierten Gene wurden mittels quantitativer qPCR analysiert. Dazu wurden die Gerüste zu den gewählten Zeitpunkten nach 14 d und 28 d mit PBS gespült und mit RLT-Lysatpuffer (inkl. 2-Mercaptoethanol) behandelt, um die *messenger RNA* (mRNA) zu isolieren. Die extrahierte mRNA wurde reverstranskribiert, um die *complementary RNA* (cRNA) zu erhalten. Die qPCR wurde mit einem *iQ SYBR Green Supermix* und einem Echtzeit-PCR-System *CFX Connect* durchgeführt. Die benutzten Primer sind in Tabelle 4 zusammengefasst. Die Resultate der Genexpression wurden auf den Gehalt des Haushaltsgens GAPDH normiert und die relative Expression wurde nach der 2<sup>- $\Delta\Delta$ Ct</sup>-Methode relativ zu Tag 0 berechnet.

**Tabelle 4:** Liste der analysierten Gene und der dafür genutzten Primer-Sequenzen.

Gene	Primer-Sequenzen	Primer bank ID / Referenz
<b>GAPDH</b>	F: CATGAGAAGTATGACAACAGCCT R: AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	7669492a3
<b>Runx2</b>	F: AGTAGGTGTCCCGCCTCAGA R: CCTTGTGGATTAAAAGGACTTGGT	[229]
<b>Osteonectin</b>	F: AGCACCCCATTGACGGGTA R: GGTCACAGGTCTCGAAAAAGC	4507171a1
<b>Osteocalcin</b>	F: CACTCCTCGCCCTATTGGC R: GCCTGGGTCTCTCACTACCT	4502401a3

**5) Von Kossa-Färbung:** Die Gerüste wurden am Tag 28 zweimal mit PBS gewaschen, mit 4% Paraformaldehyd für 1 h fixiert und zweimal mit Wasser gewaschen, bevor sie in frisch hergestellter 2% (w/v)  $\text{AgNO}_{3,\text{aq}}$ -Lösung für 10 min unter Lichtausschluss inkubiert und anschließend für 30 min mit UV-Licht bestrahlt wurden. Die Proben wurden mit Wasser gespült und an der Luft getrocknet, um danach photographiert zu werden.

**6) Alizarin-Färbung:** Die Gerüste wurden wie im vorigen Abschnitt beschrieben nach Tag 28 für die Färbung vorbereitet, wobei mit Wasser statt mit PBS gewaschen wurde. Sie wurden mit 40 mM wässriger Alizarin-Lösung (pH 4.2) für 10 min bei RT gefärbt. Anschließend wurde mehrfach mit Wasser gewaschen, um unspezifische Färbung zu entfernen. Die Proben wurden an der Luft getrocknet und photographiert.

**7) Calcium-Gehalt:** Die Calcium-Ablagerungen wurden in 400  $\mu\text{L}$  0.5 M Essigsäure gelöst und mit Hilfe eines colorimetrischen Calcium Assay-Kits nach den Herstellervorgaben quantifiziert. Zellfreie Gerüste ( $n = 2$ ) dienten als Negativkontrollen.

### 6.2.13 Kaiser-Test

Wenige Harzpartikel wurden abgenommen und dreimal mit Ethanol gewaschen. Anschließend wurden je drei Tropfen der Reagenzien A, B und C zugegeben und die Suspension 1-3 min in einem auf 80 °C vorgeheiztem Wasserbad erwärmt. Parallel wurde eine Blindprobe mit unbehandeltem Harz durchgeführt. Eine intensiv blaue bis violette Färbung zeigte die Anwesenheit freier Amin-Gruppen an, während bei einer leicht gelblichen Färbung keine Amine anwesend waren.

Reagenz A: 500 mg Ninhydrin in 10 mL Ethanol

Reagenz B: 40 g Phenol in 10 mL Ethanol

Reagenz C: 2 mL 1 mM  $\text{KCN}_{\text{aq}}$  in 98 mL destilliertem Pyridin

### 6.2.14 Kontaktwinkelmessungen

Die Kontaktwinkel von entgastem Wasser auf den einlagig gedruckten Schichten wurden zum einen statisch an einem ruhenden Tropfen ( $n = 3$ ) und zum anderen dynamisch durch die Vergrößerung und Verkleinerung eines Tropfenvolumens ( $n = 3$ ,  $2 \mu\text{L s}^{-1}$ ) an einem *FTA200 Contact Angle and Surface Tension*-Instrument (Poly-Instruments Pty. Ltd., South Melbourne, AUS) gemessen. Die Bildaufnahmen wurden mit der Software *Fta32 Video 2.0* (First Ten Angstrom Inc., Portsmouth, GBR) ausgewertet.

### 6.2.15 Massenspektrometrie (MS)

Zur Peptid-Analytik mittels ESI-MS wurde entweder ein *Shimadzu qp8000* (Duisburg, GER) oder eine Kopplung aus *Ultra Performance Liquid Chromatography*-ESI-MS und einem *LCT Premier XE*-Massenspektrometer (Waters Corporation, Milford, CT, USA) verwendet. MALDI-ToF-MS-Experimente zur Peptid- und Konjugat-Analytik wurden sowohl an einem *Bruker Autoflex III Smartbeam* (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, GER; BAM) als auch an einem *Axima-Confidence* (Kratos-Shimadzu, Manchester, GBR) durchgeführt. Für die MALDI-MS-Präparation wurden die Matrizes  $\alpha$ CHCA bzw. DHB in Wasser/Acetonitril/TFA = 1:1:0.1% (v/v/v) und die Proben in Wasser bzw. in Wasser/Acetonitril-Gemischen gelöst. Dazu wurden erst 2  $\mu$ L Matrixlösung (7 mg mL<sup>-1</sup>) und anschließend 1  $\mu$ L Probenlösung aufgetragen, um danach bei RT an der Luft zu trocknen.

### 6.2.16 Mechanische Tests

#### a) Bestimmung der Poissonzahlen

Zur Bestimmung der Poissonzahlen  $\nu_s$  aus Kapitel 3.2.1, welche das Verhältnis von radialer zu axialer Verformung beschreiben, wurden die Polymer- und Kompositproben in einer zylindrischen Metallform (4 mm Durchmesser, 1.5 mm Höhe) geschmolzen und zu dichten Formkörpern gepresst. Diese wurden anschließend auf 20% der Ausgangshöhe komprimiert und die dabei auftretende radiale Ausdehnung optisch vermessen.

**Tabelle 5: Poissonzahlen  $\nu_s$  der Polymer- und Kompositproben.**

	PCL	1 wt% cMgF <sub>2</sub>	5 wt% cMgF <sub>2</sub>	10 wt% cMgF <sub>2</sub>	15 wt% cMgF <sub>2</sub>	1 wt% pMgF <sub>2</sub>	PCL/MBC
$\nu_s$	0.32	0.35	0.31	0.32	0.30	0.29	0.27

#### b) Indentation

Die Mikroindentation wurde mit einem *TI 950* Triboindenter (Hysitron, Minneapolis, MN, USA) ausgerüstet mit einer kono-sphärischen Indenterspitze (5  $\mu$ m, 60°) auf den bündig gedruckten Einzelschichten in einem Abstand von 200  $\mu$ m zwischen den Messpunkten durchgeführt (n = 6; QUT/CARF). Dabei wurde die Kraft bis zu einer konstanten Indenterauslenkung von 1000 nm gemessen. Der Indentationsmodul  $E_{\text{indent}}$  und die Indentationhärte  $H$  wurden dazu nach der Oliver-Pharr-Methode aus den Kraft-

Weg-Kurven berechnet.<sup>[230]</sup> Hierbei war  $H$  eine Funktion der Kontakttiefe  $h_c$  und der Quotient aus der maximalen Kraft  $P_{\max}$  und der Kontaktfläche  $A(h_c)$  (Gleichung 8).

$$H = P_{\max} A(h_c)^{-1} \quad (8)$$

Der reduzierte Modul  $E_r$ , der von der Hysitron-Software ausgegeben wurde, wurde nach Gleichung 9 in den (korrigierten) Indentationsmodul  $E_{\text{indent}}$  umgerechnet.

$$E_r^{-1} = (1 - \nu_i^2) E_i^{-1} + (1 - \nu_s^2) E_{\text{indent}}^{-1} \quad (9)$$

Dabei sind  $\nu_i = 0.07$  und  $\nu_s$  die Poissonzahlen der Indenterspitze bzw. der Polymer- und Kompositproben sowie  $E_i = 1140$  GPa der bekannte E-Modul der Indenterspitze.

### c) Zug- und Kompressionsversuche

Sowohl die Zug- als auch die Kompressionsexperimente wurden an einem *Instron 5848 MicroTester* mit Hilfe von 5 N (Zug)- bzw. 500 N (Kompression)-Kraftdosen (alle Instron, Bayswater, AUS; QUT/IHBI) durchgeführt. Die elastischen Moduln aus beiden Methoden wurden als Steigung der Spannung-Dehnungskurve im linear-elastischen Bereich ca. zwischen 0-5% Dehnung bestimmt, sodass Bestimmtheitsmaße von  $R^2 > 0.999$  erreicht wurden. Bei den Zugversuchen wurden die FDM-gedruckten Einzelfilamente ( $n = 8$ , ursprüngliche Länge  $l_0 = 10$  mm) eingesetzt, welche mit einer Zuggeschwindigkeit von  $100 \text{ mm min}^{-1}$  elongiert wurden. Die Zähigkeiten wurden jeweils als Integral der Spannung-Dehnungskurve bis zum Bruch der Filamente berechnet. Für die Zähigkeiten in Kapitel 3.2.1 wurde die maximale Zugstrecke des Geräts teilweise bis auf das Maximum von 110 mm ausgereizt, sodass die Zähigkeitswerte in diesem Kapitel nur bis zu diesem Maximum von 1000% Dehnung berechnet wurden. Für die Normierung der gemessenen Werte wurde von jeder Einzelfaser mit einem *Nikon Eclipse Ti* Fluoreszenzmikroskop (Nikon, Tokyo, JPN) der Durchmesser in der Draufsicht vermessen und ausgehend von einer ideal zylindrischen Filamentform der Querschnitt berechnet.

An den FDM-gedruckten Gerüsten wurden die Kompressionsexperimente in uniaxialer Kompression zwischen einer Metallplatte und einem Metallstempel durchgeführt. Die zugeschnittenen Gerüste mit den Maßen  $(4 \times 4 \times 2.7) \text{ mm}^3$  ( $n = 8$ ) wurden bei einer Kompressionsgeschwindigkeit von  $1 \text{ mm min}^{-1}$  auf 20% der ursprünglichen Gerüsthöhe komprimiert, um den Kompressionsmodul  $E_{\text{Komp}}$  des linear-elastischen Bereichs zu bestimmen. Bei den ersten Arbeiten (Kapitel 3.2.1) war es noch möglich zur Normierung die tatsächliche Filamentdicke einzubeziehen, weil die Gerüste an einem *TM-3000* SEM (Hitachi, Tokyo, JPN) in der Draufsicht vermessen werden

konnten. Bei späteren Versuchen (Kapitel 3.2.2) wurde hingegen die gesamte Querschnittsfläche von  $(4 \times 4) \text{ mm}^2$  zur Normierung herangezogen.

## 6.2.17 Mikroskopie

### a) Rasterkraftmikroskopie (AFM)

AFM-Messungen für mikroskopische Zwecke wurden an einem *Veeco Dimension 3100* (Plainview, NY, USA) durchgeführt. Proben wurden aus verdünnter Suspension auf ein frisch abgezogenes Glimmer (*mica*)-Substrat aufgetragen und im Abzug getrocknet.

### b) Rasterelektronenmikroskopie (SEM)

Aufnahmen geringerer Vergrößerungen von  $\mu\text{m}$ -Partikeln und 3D-Gerüsten bei Abbaustudien wurden an einem *Tabletop Microscope Hitachi TM-1000* (Kapitel 3.1.2; Gruppe von Prof. Rademann, HUB) bzw. *TM-3000* (Kapitel 3.2.1; QUT/IHBI) und einem *Jeol JSM-6060* (Jeol, Eching, GER, Kapitel 3.1; QUT/IHBI) aufgenommen. Höhere Vergrößerungen von 3D-Gerüsten direkt nach dem Druck wurden an einem *LEO 1550 scanning electron microscope* (LEO GmbH, Oberkochen, GER; Kapitel 3.2.1; QUT/IHBI) und einem *FEI Quanta 200 Environmental SEM* (Carl Zeiss Microscopy GmbH, GER) (Kapitel 3.2.1 & 3.2.2, goldbeschichtet: 150 s, 30 mA (*EM SCD005*, Leica Microsystems, GER)) visualisiert (QUT/CARF).

### c) Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Die TEM-Bilder wurden an einem *Philips CM200* (Philips, Eindhoven, NLD) aufgenommen (Gruppe von Prof. Pinna, HUB). Dazu wurden die Proben aus stark verdünnten Suspensionen auf mit amorphem Kohlenstoff-beschichteten Kupfer-Gitter aufgetragen.

## 6.2.18 pH-Wert-Berechnung

Die Nettoladung des Peptids wurde über einen pH-Bereich mittels der *Open Source*-Software *PROTEIN CALCULATOR v3.4* nach Gleichung 10 berechnet.<sup>[231]</sup> Der isoelektrische Punkt lag dabei bei  $\text{pI} = 8.69$ .

$$\text{Nettoladung} = \sum N_i \frac{10^{\text{pK}_{a,i} - \text{pH}}}{10^{\text{pK}_{a,i} - \text{pH}} + 1} \quad (10)$$

## 6.2.19 Röntgendiffraktometrie (XRD)

### a) Pulver-XRD

Trockene Pulverproben wurden sowohl in Transmissionsgeometrie an einem *D8* Diffraktometer (Bruker AXS, Karlsruhe, GER; Gruppe von Dr. Emmerling, BAM) mit Cu- $K_{\alpha 1}$ -Strahlung ( $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$ ) als auch in Bragg-Brentano-Geometrie an einem *Seifert XRD 3003 TT* (GE Sensing & Inspection Technologies, Ahrensburg, GER) mit Cu- $K_{\alpha 1,2}$ -Strahlung ( $\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$ , 40 kV, 40 mA) vermessen (Gruppe von Prof. Kemnitz, HUB). Die materialcharakteristischen Diffraktogramme wurden mit der COD- bzw. der ICCD-PDF-Datenbank abgeglichen.

### b) Scherrer-Gleichung

Die mittleren Kristallitgrößen wurden nach der Scherrer-Gleichung 11 anhand der Halbwertsbreite  $\Delta$  bei  $2\theta$ , eines Formfaktors  $K = 1$  und der Wellenlänge der Röntgenstrahlung  $\lambda$  abgeschätzt.<sup>[192]</sup>

$$\text{Kristallitgröße} = K \lambda \Delta(2\theta)^{-1} \cos(\theta)^{-1} \quad (11)$$

### c) XRD an 3D-Gerüsten

Schnitte der 3D-Strukturen in Kapitel 3.2.1 wurden in Transmissionsgeometrie ( $n = 3$ ) an einem STOE MP-Diffraktometer (STOE & Cie, Darmstadt, GER; Gruppe von Prof. Pinna, HUB) zwischen  $5\text{--}65^\circ 2\theta$  mit einer Schrittweite von  $0.6$  und  $120$  s pro Schritt gemessen. Zur Auswertung wurden die Diffraktogramme mit der Software DIFFRAC.EVA (Bruker) prozessiert. Zur Bestimmung des Kristallinitätsgrads  $X_C$  wurden die Reflexe der kristallinen Anteile bei  $21.3$  und  $23.7^\circ 2\theta$  (der  $[110]$ - und  $[200]$ -Ebenen,<sup>[232]</sup> ohne Hintergrund-Subtraktion) integriert ( $I_{\text{cryst}}$ ) und mit den Integralen der amorphen Bereiche ( $I_{\text{amorph}}$ ) nach Gleichung 12 ins Verhältnis gesetzt.

$$X_C = I_{\text{cryst}} * (I_{\text{cryst}} + I_{\text{amorph}})^{-1} \quad (12)$$

## 6.2.20 Röntgenmikrocomputertomographie ( $\mu$ CT)

Die Porosität und die Partikelverteilung in den 3D-Gerüsten aus Kapitel 3.2.1 wurden an einem *Xradia Micro XCT-400* (Carl Zeiss, CA, USA) mit einer Voxel-Größe von  $0.6 \mu\text{m}$  (hohe Auflösung) bzw.  $10 \mu\text{m}$  (Übersichtscans) bestimmt (Dr. Jaroszewicz, Gruppe von Prof. Swieszkowski, Universität Warschau). Dazu wurde mit einer Röntgenquelle bei



40 kV und 250  $\mu$ A gearbeitet. Bei hoher Auflösung lagen die Belichtungszeiten bei 10 s und bei den Übersichtscans bei 4 s. Es wurden 1200 Projektionen pro Scan akkumuliert, während die Proben um 180° rotierten. Die graphische 3D-Darstellung wurde mit der Software CTAn (SkyScan von Bruker) rekonstruiert.

Für die Untersuchung der Mineralisation in Kapitel 3.2.2 wurden die Gerüstproben nach Spülen mit PBS und Fixierung in 4% PFA an einem *SMX-90CT Micro-CT scanner* (Micro focus X-ray CT sys, Shimadzu, SGP) mit 90 kV, 110  $\mu$ A, 0.046 mm/Pixel (Voxelgröße) und Skalierungskoeffizient 50 gescannt (Dr. Lim, Gruppe von Prof. Teoh, NTU). Die Scans wurden mit der Software VGStudioMax (Version 2.2) grafisch rekonstruiert.

### 6.2.21 Sol-Stabilisierungsexperimente

Verschiedene Mengen der Stabilisatoren wurden zum aufgeklärten  $\text{MgF}_2$ -Sol gegeben und für 4 h inkubiert, bevor Proben für die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Spektroskopie verwendet wurden (Gruppe von Prof. Kemnitz, HUB). Aus den weiterhin klaren Suspensionen wurde bei vermindertem Druck das Lösungsmittel komplett entfernt. Zur Redispergierung wurde Methanol hinzugefügt, um eine Konzentration von 0.1 M (bezogen auf  $\text{MgF}_2$ ) zu erreichen. Die Suspension wurde mit Ultraschall (Bad, 10 min) behandelt und für 1 h geschüttelt.

### 6.2.22 Spektroskopie

#### a) Energiedispersive Röntgenspektroskopie (EDX)

Ein *Tabletop Microscope TM-1000* (Hitachi High-Technologies Europe, Krefeld, GER) und ein *Jeol JSM-6060* (Jeol, Eching, GER) kamen bei EDX-Untersuchungen zum Einsatz. Semiquantitative Untersuchungen wurden aus mehreren punktwisen Messungen (*Spot-Analyse*) gemittelt (Gruppe von Prof. Rademann, HUB). Auch nach Ende der Inkubation der 3D-Gerüste in MEM wurde die Ablagerung von anorganischen Spezies auf der Oberfläche hiermit untersucht.

#### b) Einzelmolekülkraftspektroskopie (SMFS)

**1) Wafer-Reinigung:** Um mit einem ebenen Substrat zu beginnen, wurden Si-Wafer verwendet, die vor der Beschichtung mit einer modifizierten RCA-Methode gereinigt wurden.<sup>[233]</sup> Dabei wurden die Wafer-Teile jeweils bei 70-80 °C im Ultraschallbad für

10 min in  $\text{NH}_4\text{OH}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = 1:1:5$  (v/v/v) und anschließend für weitere 10 min in  $\text{HCl}/\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O} = 1:1:6$  (v/v/v) vorbehandelt, wobei darauf geachtet wurde, dass an der Oberfläche anhaftende Gasbläschen durch leichtes Schwenken entfernt wurden. Danach wurden die Substrate mit Wasser abgespült und in entgastem Wasser aufbewahrt.

**2) Wafer-Beschichtung mit  $\text{MgF}_2$ -Sol:** Die gereinigten Wafer-Teile (etwa 25 mm x 40 mm, rechteckig) wurden mit Druckluft getrocknet und durch Tauchbeschichtung beschichtet. Dabei wurden die Substrate für 30 s in ein unmodifiziertes 0.2 M  $\text{MgF}_2$ -Sol eingetaucht und mit einer konstanten Zuggeschwindigkeit von  $80 \text{ cm min}^{-1}$  wieder herausgezogen. Nach Ablauf der überschüssigen Flüssigkeit wurden die Substrate an der Luft getrocknet und anschließend für 30 min bei  $500^\circ\text{C}$  getempert ( $10^\circ\text{C min}^{-1}$  Heiz-/Kühlrate) zu werden.

**3) SMFS-Messungen:** Zur Messung der Abrisskräfte zwischen den Peptidbindern und der  $\text{MgF}_2$ -beschichteten Oberfläche wurde zunächst die Spitze von *Silicon-nitride MLCT* Cantilevern (Bruker AFM Probes, Camarillo, CA, USA) kovalent mit dem Peptid modifiziert (M. Göktas, Gruppe von Dr. Blank, MPI-KG).<sup>[165, 234]</sup> Dabei wurde der Cantilever erst aminofunktionalisiert, um daran einen  $\alpha$ -N-Hydroxysuccinimid-PEO- $\omega$ -maleimid-Abstandhalter ( $M_n = 50 \text{ kDa}$ , Rapp Polymere GmbH, Tübingen, GER) zu kuppeln. Nach vorheriger Reduktion eventueller Disulfidbrücken mit Partikel-immobilisiertem Tris-(2-carboxyethyl)-phosphin reagierten die Peptide über die C-terminalen Cys-Seitenketten mit den Maleimid-Gruppen des PEO- $\omega$ -Terminus. Die Kraft-Abstandskurven wurden an einem *ForceRobot® 300* (JPK Instrument AG, Berlin, Germany) bei RT mit Annäherungs- und Rückzugsgeschwindigkeiten von  $1.0 \mu\text{m s}^{-1}$  in Wasser aufgenommen. Jeder Cantilever wurde anhand der thermischen Diffusion der Spitze in Wasser kalibriert (Federkonstanten zwischen  $0.01$ - $0.03 \text{ N m}^{-1}$ ). Hunderte Einzelmessungen wurden für die statistische Auswertung aufgenommen, um nach dem *worm-like chain*-Modell angepasst zu werden, wodurch die Abrisskräfte errechnet werden konnten.<sup>[235]</sup>

### c) FT-IR-Spektroskopie

Die Spektren wurden zwischen  $600$ - $4000 \text{ cm}^{-1}$  mit Golden Gate-Technik in abgeschwächter Totalreflexion (ATR-FT-IR) an einem Jasco FT/IR-4200 FTIR-Spektrometer (Easton, MD, USA) und an einem *Bruker Vertex 70v* FT-IR-Spektrometer (Bruker, Billerica, MA, USA) unter vermindertem Druck bei RT gemessen (Gruppe von Prof. Hecht, HUB). Die IR-Banden werden anhand ihrer Intensitäten charakterisiert: sehr

intensiv (*very strong*, vs), intensiv (*strong*, s), medium (*medium*, m), schwach (*weak*, w), sehr schwach (*very weak*, vs) und breit (*broad*, b).

#### d) NMR-Spektroskopie

Flüssig-NMR-Spektren wurden an einem Bruker AVANCE II 500 ( $^1\text{H}$ - (500.13 MHz),  $^{13}\text{C}$  (125.76 MHz)) bzw. an einem Bruker AVANCE II 300 ( $^{19}\text{F}$ ) bei RT aufgenommen (Gruppe von Prof. Mügge, HUB). Bei Messungen des  $\text{MgF}_2$ -Sols wurden geschlossene Kapillaren mit  $\text{CDCl}_3$  als Referenz verwendet. Redispergierte  $\text{MgF}_2$ -Ansätze wurden für 5 min nicht bewegt bevor NMR-Proben genommen wurden. Für die  $^{19}\text{F}$ -NMR-Messungen wurden optimierte Messparameter aus der Literatur verwendet.<sup>[236]</sup> Ansonsten dienten die Protonenrestsignale der deuterierten Lösungsmittel als Referenz.

Die Festkörper-NMR-Kreuzpolarisationsexperimente  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR wurden an einem Bruker AVANCE 400 ( $^{13}\text{C}$ : 100.6 MHz) bei RT aufgenommen, wobei ein 4 mm-Probenkopf zum Einsatz kam. Die chemische Verschiebung wurde in Referenz zu Tetramethylsilan angegeben. Als Messparameter für die Spektren in Abbildung A4 wurden folgende Werte verwendet: Rotationsgeschwindigkeit = 10 kHz, *dwell time* D1 = 5 s, (A): Scanzahl ns = 2400, Kontaktzeit P15 = 1000  $\mu\text{s}$ , Akquisitionszeit AQ = 0.05 s, (B) 1.5 mL Probe, ns = 12480, P15 = 6000  $\mu\text{s}$ , AQ = 0.06 s.

#### e) Optische Emissionsspektroskopie (OES)

Während der Inkubation der 3D-Kompositgerüste in 10 mL Mg-freiem MEM, dem zur Vergleichbarkeit mit der Viabilitätsstudie  $0.1 \text{ g L}^{-1} \text{ CaCl}_2$  hinzugefügt wurde, wurden Ionen frei. Diese wurden mit Hilfe von optischer Emissionsspektroskopie an einem *ICP-OES Spektrometer 725* (Varian, Palo Alto, CA, USA) mit radialer Plasmafackel vermessen (R. Granitza, Gruppe von Dr. Recknagel, BAM).

#### f) Raman-Spektroskopie

Zur Abschätzung der Kristallinität wurden die gedruckten Gerüste aus Kapitel 3.2.1 an einem *InVia Raman*-System (Renishaw, Mulgrave, AUS) vermessen, wobei mit 10% Laserleistung (30 mW) eines 785 nm-Lasers angeregt wurde (QUT). Die Spektren wurden mit einer Akkumulationszeit von  $8 \times 40 \text{ s}$  aufgenommen ( $n = 5$ ). Der Fokus wurde durch ein 50-fach Vergrößerungsobjektiv (Gitter: 1200 Linien (engl. *grooves*))

pro mm) eingestellt. Die Streuung wurde mit einem *Ren-Cam* CCD-Detektor aufgenommen.

### **g) Röntgenphotoelektronenspektroskopie (XPS)**

Photoelektronenspektroskopie wurde an den FDM-gedruckten Strukturen mit Hilfe einer nicht-monochromatischen Mg-K $\alpha$ -Röntgenquelle (*DAR 400*, Omicron Nanotechnology) mit 1253.6 eV im Ultrahochvakuum von mindestens  $1 \cdot 10^{-10}$  mbar und einem hemisphärischen Elektronenenergieanalysator *Sphery II* (7 Kanäle, Omicron Nanotechnology, Lane Cove, AUS) durchgeführt (Dr. Gupta, Gruppe von Prof. Motta, QUT/CARF). Übersichtsscans und Hochauflösungsscans wurden mit Durchlassenergien des Analysators von 50 eV bzw. 20 eV aufgenommen. Resultierende Signale wurden durch Gauß/Lorentz-Fits mit 20% Gauß-Charakter angepasst.

### **6.2.23 Statistische Auswertungen**

Alle Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen zu verstehen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit einer einseitigen Varianzanalyse (engl. *one-way ANOVA*) mit OriginPro 9.1 durchgeführt.

## 6.3 Synthesen

### 6.3.1 Automatisierte, festphasengebundene Peptidsynthese (SPPS)

**1) Synthese:** Die automatisierte, festphasengebundene Peptidsynthese erfolgte nach Fmoc-Protokollen (ABI *FastMoc™*) mit seitenkettengeschützten Aminosäuren an ABI 433A Peptidsynthesizern der Firma Applied Biosystems (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA). In der Regel wurden Einfachkupplungen mit *N*-terminaler Acetylierung durchgeführt. Im Falle von schwierigen Sequenzen und Synthesen wurden ab der elften Aminosäure Doppelkupplungen verwendet. Die Kupplungen wurden mittels (2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium-hexafluorophosphat) (HBTU) und Diisopropylethylamin (DIPEA) unterstützt. Nach Ende der Synthese wurden die Peptide final entschützt und mit *N*-Methyl-2-pyrrolidon (NMP) und Dichlormethan (DCM) gewaschen.

**2) Abspaltung:** Das Harz wurde erneut mit DCM gewaschen und bei 10 mbar und RT mindestens 4 h getrocknet bevor das Peptid mit TFA/DCM/Triethylsilan (TES) = 50:45:5 (v/v/v) für zweimal 1 h abgespalten wurde. War Fmoc-Arg(2,2,4,6,7-pentamethyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl)-OH (Fmoc-Arg(Pbf)-OH) in der Sequenz enthalten, wurde bei der zweiten Abspaltung TFA/Wasser/TES = 95:4:1 (v/v/v) verwendet. Bei Anwesenheit von Cys wurde in diesem Fall keine abweichende Abspaltlösung eingesetzt, weil die Peptide vor der Nutzung für die SMFS frisch reduziert wurden. Die Peptide wurden in kaltem Diethylether gefällt, erneut in wenig TFA aufgenommen und wieder in kaltem Diethylether gefällt. Anschließend wurden die Peptide durch Dialyse oder im Fall der SMFS durch prep-HPLC aufgereinigt. Peptide, deren Analytik in dieser Arbeit nicht aufgeführt ist, sind in der Literatur zu finden.<sup>[140]</sup>

Bei Peptid-PEG-Konjugaten wurde analog verfahren, wobei TentaGel® PAP Harze zum Einsatz kamen. Abgespalten wurde dabei mit TFA/Bromotrimethylsilan (TMSBr) = 99:1 (v/v) für 6 h. Die Aufreinigung erfolgte nach der ersten Fällung mit Hilfe der *fast protein liquid chromatography* (FPLC).

**3) Fam-Kupplung:** Die Fam-Kupplungen erfolgten noch am festen Träger unter Lichtausschluss, wobei eine geringe Menge des Harzes für Analysezwecke unmarkiert blieb. Das Harz eines 0.1 mmol-Ansatzes wurde in 2 mL einer Reaktionslösung aus Fam (376 mg, 1 mmol, 10 Äq.), Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoniumhexafluorophosphat (PyBOP) (520 mg, 1 mmol, 10 eq.) und *N*-Methylmorpholin (NMM) (220 µL, 2 mmol, 20 eq.) doppelt gekuppelt (zweimal mindestens 2 h). Anschließend

wurde das markierte Harz gründlich mit NMP und DCM gewaschen und bei 10 mbar und RT über Nacht getrocknet bevor es abgespalten wurde.

### 6.3.2 Peptid-Polymer-Konjugate

#### a) **MBC:** *H*-GGTQYYAYSTTQKS-*block*-PEG<sub>73</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels.

MS (MALDI-ToF)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  berechnet: 4944.03, gemessen: 4944.2;

$\Delta m = 44$   $m/z$ , charakteristisch für Ethylenglykol-Wiederholungseinheiten;

$M_{\text{berechnet}} = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG},n} + H = 4944.03$  Da. Die Masse konnte mit einer Abweichung von  $\Delta 0.2$   $m/z$  nachgewiesen werden (Abbildung E1).

$^1\text{H}$ -NMR (500 MHz, TFA- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 7.30-6.83 (m, 12H; Ar  $H_Y$ ), 5.40-4.25 (m, 28H;  $2\times\text{CH}_{2,G}$ ,  $6\times\text{CH}_T$ ,  $2\times\text{CH}_Q$ ,  $3\times\text{CH}_Y$ ,  $\text{CH}_A$ ,  $2\times\text{CH}_S$ ,  $2\times\text{CH}_{2,S}$ ,  $\text{CH}_K$ ), 4.15-3.81 (m, 304H;  $\text{CH}_{2,\text{PEG}}$ ), 3.39-2.89 (m, 8H;  $3\times\text{CH}_{2,Y}$ ,  $\text{CH}_{2,K}$ ), 2.88-2.60 (m, 4H;  $2\times\text{CH}_{2,Q}$ ), 2.60-2.17 (m, 4H;  $2\times\text{CH}_{2,Q}$ ), 2.13-1.86 (m, 4H;  $2\times\text{CH}_{2,K}$ ), 1.78-1.42 (m, 14H;  $\text{CH}_{2,K}$ ,  $3\times\text{CH}_{3,T}$ ,  $\text{CH}_{3,A}$ ).

ATR-FT-IR:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3276 (m; N-H Amid A), 2945-2860 (vs, C-H), 1623 (s, C=O Amid I), 1535 (m, N-H Amid II), 1466 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1359 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1096 (s, C-O- $\text{C}_{\text{PEG}}$ ).

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR von MBC auf  $\text{MgF}_2$  (getrockneter Zustand):  $\delta$  [ppm] = 172 ( $\text{C}_{\text{Amide}}$ ), 157 (C-OH<sub>Tyr</sub>), 131 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , Tyr), 116 ( $\text{CH}_{\text{Ar}}$ , Tyr), 71 ( $\text{CH}_{2,\text{PEG}}$ ), 60-53 ( $\text{C}_{\text{Amide}}$ ,  $\text{CH}_{2,\text{Ser}}$ ), 43-40 ( $\text{CH}_{2,\text{Gly}}$ ), 35-31 ( $\text{CH}_{2,\text{Gln,Lys}}$ ), 23-20 ( $\text{CH}_3,\text{Thr}$ ).

$^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  CP MAS NMR von MBC auf  $\text{MgF}_2$  (in Methanol):  $\delta$  [ppm] = 1172 ( $\text{C}_{\text{Amide}}$ , sehr schwach), 71 ( $\text{CH}_{2,\text{PEG}}$ ).

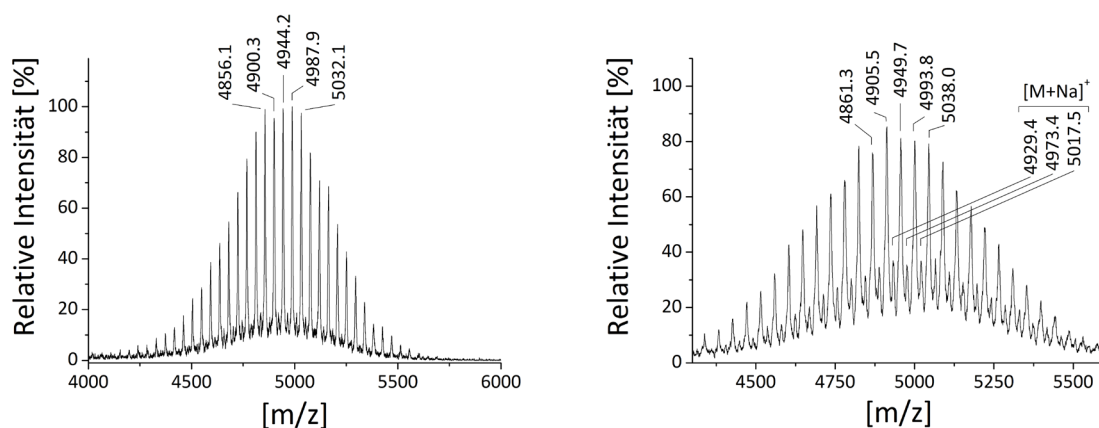


Abbildung E1: MALDI-ToF-MS von MBC (links) und Fam-MBC (rechts).

#### b) **Fam-MBC:** Fam-GG-TQYYAYSTTQKS-*block*-PEG<sub>73</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels.

MS (MALDI-ToF)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  berechnet: 4949.84, gemessen: 4949.7;

$\Delta m = 44 \text{ m/z}$ , charakteristisch für Ethylenglykoleinheiten;

$M_{\text{berechnet}} = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG},n} + H = 4949.84 \text{ Da}$ . Die Masse konnte mit einer Abweichung von  $\Delta 0.1 \text{ m/z}$  nachgewiesen werden (Abbildung E1).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.38-7.35 (m, 9H; Ar  $H_{\text{Fam}}$ ), 7.46-7.08 (m, 12H; Ar  $H_Y$ ), 5.89-4.69 (m, 28H;  $2 \times \text{CH}_{2,G}$ ,  $6 \times \text{CH}_T$ ,  $2 \times \text{CH}_Q$ ,  $3 \times \text{CH}_Y$ ,  $\text{CH}_A$ ,  $2 \times \text{CH}_S$ ,  $2 \times \text{CH}_{2,S}$ ,  $\text{CH}_K$ ), 4.16-3.80 (m, 304H;  $\text{CH}_{2,\text{PEG}}$ ), 3.89-2.00 (m, 20H;  $3 \times \text{CH}_{2,Y}$ ,  $3 \times \text{CH}_{2,K}$ ,  $4 \times \text{CH}_{2,Q}$ ), 1.99-1.56 (m, 14H;  $\text{CH}_{2,K}$ ,  $3 \times \text{CH}_{3,T}$ ,  $\text{CH}_{3,A}$ ).

ATR-FT-IR:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3276 (m; N-H Amid A), 2974-2861 (vs, C-H), 1623 (s, C=O Amid I), 1535 (m, N-H Amid II), 1461 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1389 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1205 (m, O-H Phenol), 1112 (s, O-H).

### c) $\text{MBC}^{\text{SC}}$ : *H*-GG-AKTSYTYQSTYQ-*block*-PEG<sub>73</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels.

MS (MALDI-ToF)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  berechnet: 5099.03, gemessen: 5099.2;

$\Delta m = 44 \text{ m/z}$ , charakteristisch für Ethylenglykol-Wiederholungseinheiten;

$M_{\text{berechnet}} = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG},n} + H = 5099.03 \text{ Da}$ . Die Masse konnte mit einer Abweichung von  $\Delta 0.2 \text{ m/z}$  nachgewiesen werden (Abbildung E2).

ATR-FT-IR:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3276 (m; N-H Amid A), 2945-2860 (vs, C-H), 1623 (s, C=O Amid I), 1535 (m, N-H Amid II), 1467 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1359 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1094 (s, C-O-C<sub>PEG</sub>).

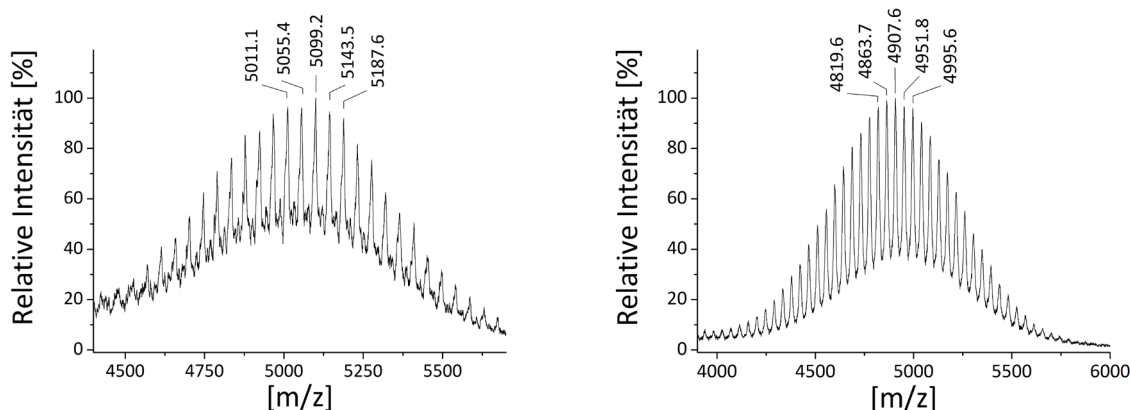


Abbildung E2: MALDI-ToF-MS von  $\text{MBC}^{\text{SC}}$  (links) und  $\text{Fam-MBC}^{\text{SC}}$  (rechts).

### d) $\text{Fam-MBC}^{\text{SC}}$ : *Fam*-GG-AKTSYTYQSTYQ-*block*-PEG<sub>73</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels.

MS (MALDI-ToF)  $m/z$ :  $[M+H]^+$  berechnet: 4907.15, gemessen: 4907.6;

$\Delta m = 44 \text{ m/z}$ , charakteristisch für Ethylenglykol-Wiederholungseinheiten;

$M_{\text{berechnet}} = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG},n} + H = 4907.15 \text{ Da}$ . Die Masse konnte mit einer Abweichung von  $\Delta 0.5 \text{ m/z}$  nachgewiesen werden (Abbildung E2).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.40-7.31 (m, 9H; Ar  $H_{\text{Fam}}$ ), 7.21-6.73 (m, 12H; Ar  $H_Y$ ), 5.24-4.17 (m, 23H;  $2 \times \text{CH}_{2,G}$ ,  $6 \times \text{CH}_T$ ,  $2 \times \text{CH}_Q$ ,  $3 \times \text{CH}_Y$ ,  $\text{CH}_A$ ,  $2 \times \text{CH}_S$ ,  $2 \times \text{CH}_{2,S}$ ,  $\text{CH}_K$ ), 4.11-3.66 (m, 320H;  $\text{CH}_{2,\text{PEG}}$ ), 3.32-3.21 (m, 2H;  $\text{CH}_{2,K}$ ), 3.09-2.60 (m, 12H;  $3 \times \text{CH}_{2,Y}$ ,  $\text{CH}_{2,K}$ ,  $2 \times \text{CH}_{2,Q}$ ), 2.37-1.81 (m, 10H;  $2 \times \text{CH}_{2,Q}$ ,  $3 \times \text{CH}_{2,K}$ ), 1.73-1.16 (m, 12H;  $3 \times \text{CH}_{3,T}$ ,  $\text{CH}_{3,A}$ ).

ATR-FT-IR:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3276 (m; N-H Amid A), 2974-2861 (vs, C-H), 1623 (s, C=O Amid I), 1535 (m, N-H Amid II), 1461 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1389 (m,  $\text{CH}_2$ ), 1112 (m, O-H), 1096 (s, C-O- $\text{C}_{\text{PEG}}$ ).

#### **e) Fam-cyc(MBC):** Fam-cyc(K(Fam)-TQYYAYSTTQKS-D(*block*-PEG<sub>73</sub>))

Die entsprechende Menge eines TentaGel® PAP-Harzes für einen 0.1 mmol-Ansatz wurde 1 h in NMP gequollen. (i) Nach Entfernung des NMPs wurde eine Lösung von 158.2 mg (0.4 mmol, 4 Äq.) Fmoc-Asp-OAll, 208.6 mg (0.4 mmol, 4 Äq.) PyAOP und 66  $\mu\text{L}$  (60.7 mg, 0.6 mmol, 6 Äq.) NMM in 4 mL NMP zugegeben, über Nacht geschüttelt, danach das Harz gründlich mit NMP und DCM gewaschen (Abbildung 24). (ii) Ausgehend von der ungeschützten Seitenkette des Asp wurde die restliche Sequenz mit Hilfe der automatisierten SPPS nach ABI *FastMoc*<sup>TM</sup>-Protokollen beginnend mit Fmoc-Lys(Dde)-OH durchgeführt, wonach das Harz manuell mit DCM gewaschen wurde. (iii) Das trockene Harz wurde unter Schutzgasatmosphäre für 2 h in NMP gequollen, das NMP wieder entfernt und im Ar-Gegenstrom eine Suspension aus 476 mg (0.4 mmol, 4 Äq.)  $\text{Pd(PPh}_3)_4$  in 4 mL DCM/Essigsäure/NMM = 37:2:1 (v/v/v) zugegeben. Das Gemisch wurde 2 h unter Lichtausschluss geschüttelt und das Harz anschließend jeweils fünf Mal mit 5 mL DMF/DIPEA = 95:5 (v/v), Natriumdiethyldithiocarbaminat-Trihydrat/DMF = 5:95 (m/v), DMF und NMP gewaschen. (iv) Zur Zyklisierung des Peptids wurde dem Harz eine Lösung aus 104.3 mg (0.2 mmol, 2 Äq.) PyAOP und 68  $\mu\text{L}$  (51.7 mg, 0.4 mmol, 4 Äq.) DIPEA in 5 mL NMP unter Schutzgasatmosphäre zugegeben und für 72 h geschüttelt. Dieser Schritt wurde wiederholt und das Gemisch für 18 h geschüttelt. Ein negativer Kaiser-Test (siehe Kapitel 6.2) zeigte die Abwesenheit von freien Aminen und damit eine erfolgreiche Zyklisierung an. Danach wurde das Harz mit NMP gewaschen, (v) bevor die Dde-Schutzgruppe mit 5 mL Hydrazin-Monohydrat/DMF = 2:98 (v/v) in 15 min entfernt wurde. Dann wurde gründlich mit DMF und NMP gewaschen, um eine Fam-Doppelkupplung (wie in Kapitel 6.3.1 beschrieben) durchzuführen. (vi) Mit TFA/TMSBr/Thioanisol = 94:1:5 (v/v/v) wurde



das zyklisierte Peptid-PEG-Konjugat erst für 1 min, dann erneut für 1 h abgespalten, in kaltem Diethylether gefällt, über Nacht getrocknet und zur Aufreinigung dialysiert.

MS (MALDI-ToF)  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  berechnet: 5259.01, gemessen: 5259.8;

$\Delta m = 44 \text{ m/z}$ , charakteristisch für Ethylenglykol-Wiederholungseinheiten;

$M_{\text{berechnet}} = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG},n} + Na = 5259.01 \text{ Da}$ . Die Masse konnte mit einer Abweichung von  $\Delta 0.8 \text{ m/z}$  nachgewiesen werden (Abbildung E3).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 8.36-7.36 (m, 4H; Ar  $H_{\text{Fam}}$ ), 7.60-6.78 (m, 12H; Ar  $H_Y$ ), 5.36-5.13 (m, 2H;  $2 \times \text{CH}_Q$ ), 5.12-4.57 (m, 25H;  $\text{CH}_D$ ,  $6 \times \text{CH}_T$ ,  $\text{CH}_A$ ,  $3 \times \text{CH}_Y$ ,  $2 \times \text{CH}_Q$ ,  $3 \times \text{CH}_Y$ ,  $\text{CH}_A$ ,  $2 \times \text{CH}_S$ ,  $2 \times \text{CH}_{2,S}$ ,  $2 \times \text{CH}_K$ ), 3.98-3.91 (m, 320H;  $\text{CH}_{2,\text{PEG}}$ ), 3.87-1.55 (m, 28H;  $\text{CH}_{2,D}$ ,  $3 \times \text{CH}_{2,S}$ ,  $2 \times \text{CH}_{2,Q}$ ,  $8 \times \text{CH}_{2,K}$ ,  $2 \times \text{CH}_{2,Q}$ ,  $3 \times \text{CH}_{2,Y}$ ), 1.55-1.35 (m, 12H;  $3 \times \text{CH}_{3,T}$ ,  $\text{CH}_{3,A}$ ).

ATR-FT-IR:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3278 (vw, N-H Amid), 2878 (m, C-H), 1624 (s, C=O Amid), 1518 (m, C-C Aromat), 1337 (m, O-H Phenol), 1095 (vs, C-O Ether), 845 (b, C-C Aromat).

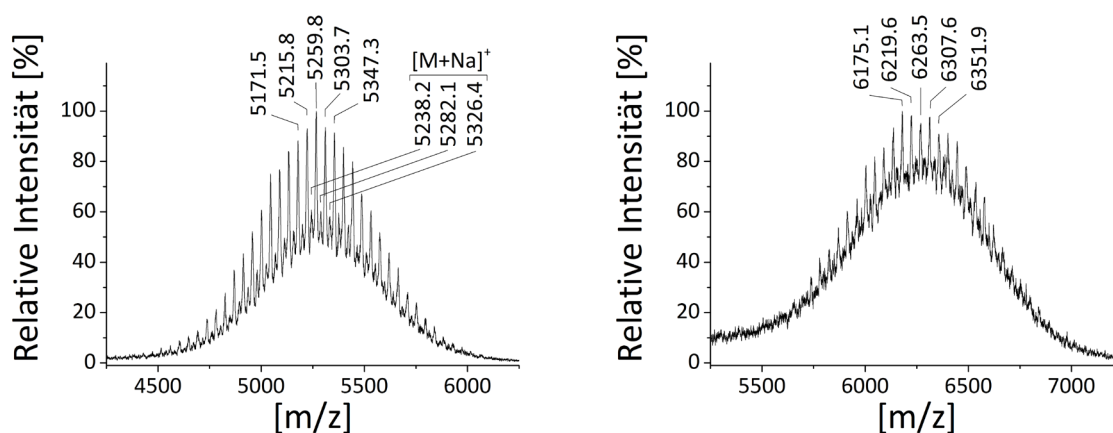


Abbildung E3: MALDI-ToF-MS von Fam-cyc(MBC) (links) und Fam-lin(MBC)<sub>2</sub> (rechts).

#### f) Fam-lin(MBC)<sub>2</sub>: Fam-GG-(TQYYAYSTTQKS)<sub>2</sub>-*block*-PEG<sub>73</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels, wobei nach der Verzweigung mit Hilfe von Fmoc-Lys(Fmoc)-OH derselbe Überschuss an Aminosäuren angeboten wurde wie für einen Standard-0.1 mmol-Ansatz. Die Fam-Kupplung nutzte denselben Überschuss an Reagenzien wie bei nur einem N-Terminus.

MS (MALDI-ToF)  $m/z$ :  $[M+Na]^+$  berechnet: 6263.44, gemessen: 6263.5;

$\Delta m = 44 \text{ m/z}$ , charakteristisch für Ethylenglykol-Wiederholungseinheiten;

$M_{\text{berechnet}} = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG},n} + Na = 6263.44 \text{ Da}$ . Die Masse konnte mit einer Abweichung von  $\Delta 0.1 \text{ m/z}$  nachgewiesen werden (Abbildung E3).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.11-7.46 (m, 14H; Ar  $H_{\text{Fam}}$ ), 7.41-6.79 (m, 24H; Ar  $H_Y$ ), 5.91-3.54 (m, 42H;  $2 \times \text{CH}_{2,G}$ ,  $12 \times \text{CH}_T$ ,  $4 \times \text{CH}_Q$ ,  $6 \times \text{CH}_Y$ ,  $2 \times \text{CH}_A$ ,  $4 \times \text{CH}_S$ ,  $4 \times \text{CH}_{2,S}$ ,

2×CH<sub>K</sub>), 4.12-3.80 (m, 280H; CH<sub>2,PEG</sub>), 3.40-1.80 (m, 48H; 8×CH<sub>2,K</sub>, 6×CH<sub>2,Y</sub>, 2×CH<sub>2,K</sub>, 8×CH<sub>2,Q</sub>), 1.73-1.31 (m, 24H; 6×CH<sub>3,T</sub>, 2×CH<sub>3,A</sub>).

ATR-FT-IR:  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3274 (w, N-H Amid), 2873 (m, C-H), 1624 (s, C=O Amid), 1518 (m, C-C Aromat), 1346 (m, O-H Phenole), 1091 (b, C-O Ether), 699 (b, N-H Amid).

**g) br(MBC)<sub>2</sub>:** *H*-GG-(TQYYAYSTTQKS)<sub>2</sub>-K-*block*-PEG<sub>73</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels, wobei nach der Verzweigung mit Hilfe von Fmoc-Lys(Fmoc)-OH derselbe Überschuss an Aminosäuren angeboten wurde wie für einen Standard-0.1 mmol-Ansatz.

MS (MALDI-ToF)  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> berechnet: 6277.55, gemessen: 6278.0;

$\Delta m = 44$   $m/z$ , charakteristisch für Ethylenglykol-Wiederholungseinheiten;

$M_{\text{berechnet}} = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG},n} + \text{Na} = 6277.55$  Da. Die Masse konnte mit einer Abweichung von  $\Delta 0.5$   $m/z$  nachgewiesen werden (Abbildung E4).

ATR-FT-IR:  $\nu$  [cm<sup>-1</sup>] = 3280 (m, N-H Amid A), 3078 (w, Amid II), 2975-2860 (vs, C-H), 1622 (s, C=O Amid I), 1518 (m, N-H Amid II), 1200 (m, O-H Phenole).

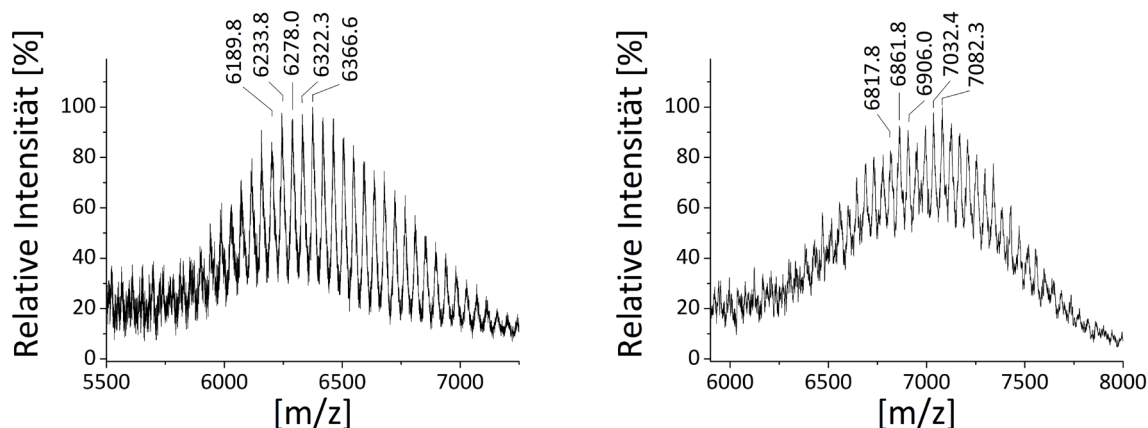


Abbildung E4: MALDI-ToF-MS von br(MBC)<sub>2</sub> (links) und Fam-br(MBC)<sub>2</sub> (rechts).

**h) Fam-br(MBC)<sub>2</sub>:** Fam-GG-(TQYYAYSTTQKS)<sub>2</sub>-K-*block*-PEG<sub>73</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels, wobei nach der Verzweigung mit Hilfe von Fmoc-Lys(Fmoc)-OH derselbe Überschuss an Aminosäuren angeboten wurde wie für einen Standard-0.1 mmol-Ansatz. Die Fam-Kupplung nutzte denselben Überschuss an Reagenzien wie bei nur einem *N*-Terminus. Gefunden wurde die Masse inkl. zwei Carboxyfluorescein-Gruppen.

MS (MALDI-ToF)  $m/z$ : [M+Na]<sup>+</sup> berechnet: 6861.56, gemessen: 6861.8;

$\Delta m = 44$   $m/z$ , charakteristisch für Ethylenglykol-Wiederholungseinheiten;

$M_{\text{berechnet}} = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG},n} + \text{Na} = 6861.56 \text{ Da}$ . Die Masse konnte mit einer Abweichung von  $\Delta 0.2 \text{ m/z}$  nachgewiesen werden (Abbildung E4).

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.05-7.21 (m, 6H; Ar  $H_{\text{Fam}}$ ), 7.21-6.80 (m, 24H; Ar  $H_Y$ ), 5.84-3.74 (m, 42H;  $2 \times \text{CH}_{2,G}$ ,  $12 \times \text{CH}_T$ ,  $4 \times \text{CH}_Q$ ,  $6 \times \text{CH}_Y$ ,  $2 \times \text{CH}_A$ ,  $4 \times \text{CH}_S$ ,  $4 \times \text{CH}_{2,S}$ ,  $2 \times \text{CH}_K$ ), 4.12-3.80 (m, 360H;  $\text{CH}_{2,\text{PEG}}$ ), 3.37-1.81 (m, 48H;  $8 \times \text{CH}_{2,K}$ ,  $6 \times \text{CH}_{2,Y}$ ,  $2 \times \text{CH}_{2,K}$ ,  $8 \times \text{CH}_{2,Q}$ ), 1.55-1.37 (m, 24H;  $6 \times \text{CH}_{3,T}$ ,  $2 \times \text{CH}_{3,A}$ ).

ATR-FT-IR:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3284 (m, N-H Amid A), 3078 (w, Amid II), 2975-2860 (vw, C-H), 1760 (vw, C=O Ester), 1621 (s, C=O Amid I), 1532 (m, N-H Amid II), 1201 (m, O-H Phenole), 1135 (m, O-H).

#### i) Fam-star(MBC)<sub>3</sub>: Fam-GG-(TQYYAYSTTQKS)<sub>2</sub>-K-TQYYAYSTTQKS-*block*-PEG<sub>73</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels, wobei nach der Verzweigung mit Hilfe von Fmoc-Lys(Fmoc)-OH der gleiche Überschuss an Aminosäuren angeboten wurde wie für einen Standard-0.1 mmol-Ansatz. Die Fam-Kupplung nutzte den gleichen Überschuss an Reagenzien wie bei nur einem N-Terminus. Gefunden wurde die Masse inkl. einer Carboxyfluorescein-Gruppe.

MS (MALDI-ToF)  $m/z$ :  $[M+\text{Na}]^+$  berechnet: 7133.65, gemessen: 7134.0;

$\Delta m = 44 \text{ m/z}$ , charakteristisch für Ethylenglykol-Wiederholungseinheiten;

$M_{\text{berechnet}} = M_{\text{Peptid}} + M_{\text{PEG},n} + \text{Na} = 7133.65 \text{ Da}$ . Das Signal bei 7134  $m/z$  liegt in der erwarteten Größenordnung, konnte allerdings mit den üblichen Matrices und Vorbereitungsmethoden nicht besser desorbiert bzw. ionisiert werden (Abbildung E5). Durch NMR-Messungen konnte das Vorhandensein der dreifachen Peptid-Sequenz anhand der meisten Seitenkettenprotonen nachgewiesen werden.

$^1\text{H-NMR}$  (500 MHz, TFA- $d_4$ ):  $\delta$  [ppm] = 9.10-7.32 (m, 11H; Ar  $H_{\text{Fam}}$ ), 7.24-6.84 (m, 36H; Ar  $H_Y$ ), 5.91-3.70 (m, 63H;  $3 \times \text{CH}_{2,G}$ ,  $18 \times \text{CH}_T$ ,  $6 \times \text{CH}_Q$ ,  $9 \times \text{CH}_Y$ ,  $3 \times \text{CH}_A$ ,  $6 \times \text{CH}_S$ ,  $6 \times \text{CH}_{2,S}$ ,  $3 \times \text{CH}_K$ ), 3.99-3.91 (m, 340H;  $\text{CH}_{2,\text{PEG}}$ ), 3.37-1.60 (m, 72H;  $12 \times \text{CH}_{2,K}$ ,  $9 \times \text{CH}_{2,Y}$ ,  $3 \times \text{CH}_{2,K}$ ,  $12 \times \text{CH}_{2,Q}$ ), 1.51-1.40 (m, 36H;  $9 \times \text{CH}_{3,T}$ ,  $3 \times \text{CH}_{3,A}$ ).

ATR-FT-IR:  $\nu$  [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3278 (w, N-H Amid), 2873 (m, C-H), 1619 (s, C=O Amid), 1514 (m, C-C Aromat), 1346 (m, O-H Phenole), 1091 (b, C-O Ether), 687 (b, N-H Amid).

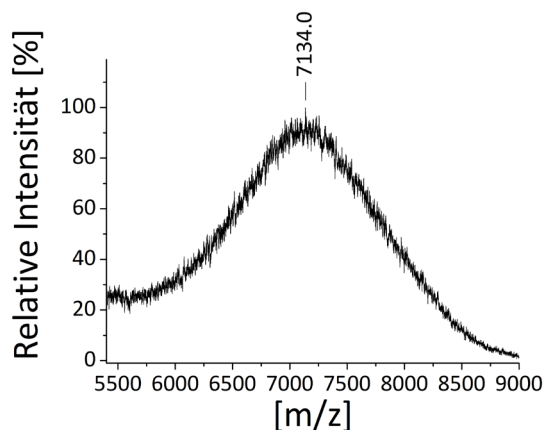


Abbildung E5: MALDI-ToF-MS von Fam-star(MBC)<sub>3</sub>. Auf Grund der hohen Masse und der Fluoreszenzmarkierung war die Desorption/Ionisation erschwert.

**j) MBP-Cys:** *H*-GG-TQYYAYSTTQKS-GGC-NH<sub>2</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels. Das Peptid wurde mittels prep-HPLC aufgereinigt (Abbildung E6).

UPLC (210 nm):  $t_R = 1.45$  min (Gradient: 5-50% Acetonitril, 4 min);

MS (ESI) [m/z]: [M+2H]<sup>2+</sup> gemessen: 886.4 ( $\Delta 0.1$ ), [M+3H]<sup>3+</sup> gemessen: 591.2 ( $\Delta 0.1$ ), [M+3H+K]<sup>4+</sup> gemessen: 453.2 ( $\Delta 0.03$ ).

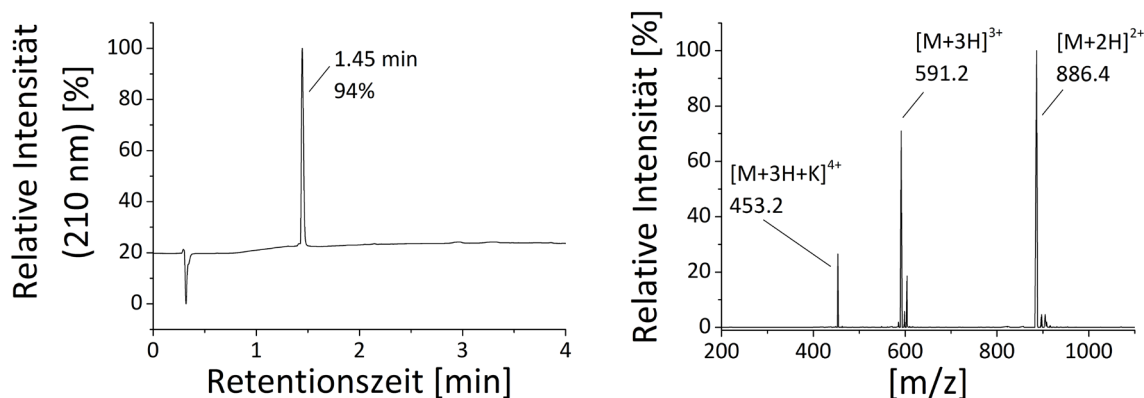


Abbildung E6: Charakterisierung des mittels prep-HPLC aufgereinigten Peptids MBP-Cys: UPLC-Chromatogramm (links, 210 nm, 5-50% Acetonitril, 4 min) und ESI-Massenspektrum des UPLC-Signals bei 1.45 min (rechts).

**k) MBP<sup>SC</sup>-Cys:** *H*-GG-AKTSYTYQSTYQ-GGC-NH<sub>2</sub>

Die Synthese folgte dem allgemeinen Protokoll am Beginn dieses Kapitels. Das Peptid wurde mittels prep-HPLC aufgereinigt (Abbildung E7).

UPLC (210 nm):  $t_R = 1.45$  min (Gradient: 5-50% Acetonitril, 4 min);

MS (ESI) [m/z]: [M+2H]<sup>2+</sup> gemessen: 886.4 ( $\Delta 0.1$ ), [M+2H+K]<sup>3+</sup> gemessen: 603.9 ( $\Delta 0.1$ ), [M+3H]<sup>3+</sup> gemessen: 591.2 ( $\Delta 0.1$ ), [M+3H+K]<sup>4+</sup> gemessen: 453.2 ( $\Delta 0.03$ ).

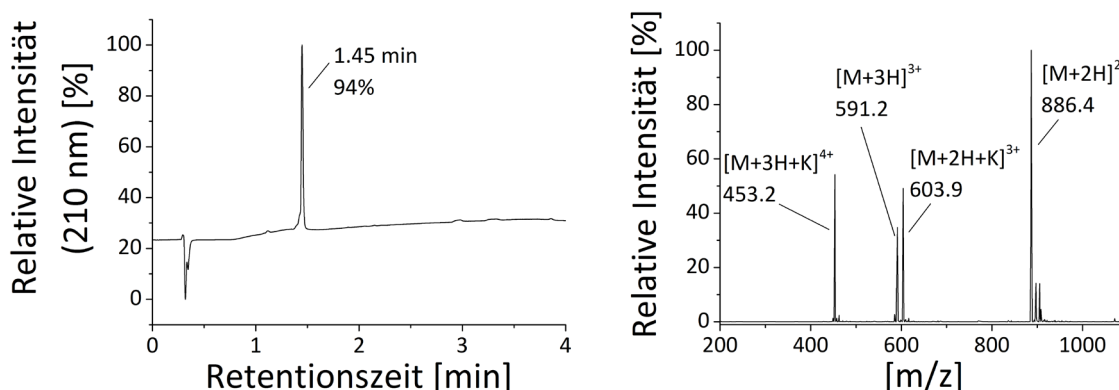


Abbildung E7: Charakterisierung des mittels prep-HPLC aufgereinigten Referenz-Peptids MBP<sup>SC</sup>-Cys: UPLC-Chromatogramm (links, 210 nm, 5-50% Acetonitril, 4 min) und ESI-Massenspektrum des UPLC-Signals bei 1.45 min (rechts).

### 6.3.3 MgF<sub>2</sub>-Synthese

Die Synthese des MgF<sub>2</sub>-Sols wurde unter Inert-Bedingungen (Ar) mit Standard-Schlenk-Techniken durchgeführt. Für einen exemplarischen Ansatz wurden Mg-Späne (2.43 g, 100 mmol) wurden in 500 mL trockenem Methanol gelöst, um eine klare 0.2 mM Lösung von Mg(OCH<sub>3</sub>)<sub>2</sub> zu erhalten. Eine stöchiometrische Menge von methanolischem Fluorwasserstoff wurde langsam unter Wasserkühlung und starkem Rühren zugetropft. Nach Alterung unter Inert-Bedingungen über 2-3 Wochen klarte das MgF<sub>2</sub>-Sol optisch auf.

<sup>19</sup>F-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub> in abgeschlossener Glaskapillare) δ [ppm]: -154 (BF<sub>4</sub><sup>-</sup> aus der Reaktion mit der Glaswand des Reaktionsgefäßes), -187 (HF<sub>adsorbiert</sub>), -198 ppm (MgF<sub>2</sub>).

DLS: siehe Kapitel 3.1.2.

### 6.3.4 Kompositherstellung

Für die Herstellung der Komposite aus Kapitel 3.2.1 wurde das aufgeklärte MgF<sub>2</sub>-Sol für 4 h mit 3 mol% (bezogen auf n(MgF<sub>2</sub>)) MBC inkubiert. Aus PCL Capa 6500C (M<sub>w</sub> = 50 kDa, Perstorp, SWE) und Tetrahydrofuran wurde bei RT eine 50%ige (w/v) Lösung hergestellt, das kompatibilisierte Sol unter starkem Rühren hinzugefügt, für 5 min gerührt und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt. Das Rohkomposit wurde für 48 h im Hochvakuum weiter getrocknet. Die getrockneten Komposite wurden für den 3D-Druck eingesetzt.

Die Herstellung der Komposite aus Kapitel 3.2.2 erfolgte nach der lösungsmittelarmen, Tieftemperatur-Vermischung in einer Retsch® Cryomill (Retsch®, Haan, GER; Dr. Lim, Gruppe von Prof. Teoh, NTU).<sup>[211]</sup> Dazu wurde das kompatibilisierte MgF<sub>2</sub>-Sol für 1 h bei -80 °C eingefroren, bevor es in einen Kryomahlbecher überführt wurde, der die entsprechenden Mengen an PCL (*Purasorb*® PC 12, Corbion, Amsterdam, NLD) und nHA und/oder cMgF<sub>2</sub> enthielt. Nach dem Mahlprozess wurde das vermengte Pulver sorgfältig aus der Mühle entfernt und in einem verschlossenen Behältnis aufbewahrt. Die Komposite wurden vor dem 3D-Druck für 48 h unter vermindertem Druck getrocknet.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] a) D. C. Leslie, A. Waterhouse, J. B. Berthet, T. M. Valentin, A. L. Watters, A. Jain, P. Kim, B. D. Hatton, A. Nedder, K. Donovan, E. H. Super, C. Howell, C. P. Johnson, T. L. Vu, D. E. Bolgen, S. Rifai, A. R. Hansen, M. Aizenberg, M. Super, J. Aizenberg, D. E. Ingber, *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 1134; b) C. Sanchez, B. Julian, P. Belleville, M. Popall, *J. Mater. Chem.* **2005**, 15, 3559.
- [2] P. Eyerer, T. Hirth, P. Elsner, *Polymer Engineering*, Springer, Berlin, Heidelberg **2008**.
- [3] U. G. K. Wegst, H. Bai, E. Saiz, A. P. Tomsia, R. O. Ritchie, *Nat. Mater.* **2015**, 14, 23.
- [4] a) J. Y. Shu, B. Panganiban, T. Xu, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **2013**, 64, 631; b) J.-F. Lutz, H. G. Börner, *Progr. Polym. Sci.* **2008**, 33, 1; c) P. Wilke, N. Helfricht, A. Mark, G. Papastavrou, D. Faivre, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2014**, 136, 12667; d) S. Wieczorek, E. Krause, S. Hackbarth, B. Röder, A. K. H. Hirsch, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2013**, 135, 1711.
- [5] Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF), Referat Gesundheitswirtschaft, *Regenerative Medizin: Selbstheilungskraft des Körpers verstehen und nutzen*, Bonn, Berlin **2013**.
- [6] P. V. Giannoudis, H. Dinopoulos, E. Tsiridis, *Injury* **2005**, 36, S20.
- [7] C. Laurencin, Y. Khan, S. F. El-Amin, *Expert Rev. Med. Devices* **2006**, 3, 49.
- [8] R. James, M. Deng, C. T. Laurencin, S. G. Kumbar, *Front. Mater. Sci. China* **2011**, 5, 342.
- [9] L. G. Zhang, A. Khademhosseini, T. Webster, *Tissue and Organ Regeneration: Advances in Micro- and Nanotechnology*, Pan Stanford Publishing, Stanford **2016**.
- [10] R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, P. Giannoudis, *BMC Med.* **2011**, 9, 66.
- [11] a) B. M. Holzapfel, J. C. Reichert, J.-T. Schantz, U. Gbureck, L. Rackwitz, U. Nöth, F. Jakob, M. Rudert, J. Groll, D. W. Hutmacher, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, 65, 581; b) D. Tang, R. S. Tare, L.-Y. Yang, D. F. Williams, K.-L. Ou, R. O. C. Oreffo, *Biomaterials* **2016**, 83, 363.
- [12] Y. Liu, D. Luo, T. Wang, *Small* **2016**, doi: 10.1002/smll.201600626.
- [13] A. George, A. Veis, *Chem. Rev.* **2008**, 108, 4670.
- [14] M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee, R. Kumar, Y.-Y. Kim, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, L. B. Gower, *Mater. Sci. Eng., R* **2007**, 58, 77.
- [15] J. R. Dorvee, A. Veis, *J. Struct. Biol.* **2013**, 183, 278.
- [16] F. M. Michael, M. Khalid, R. Walvekar, C. T. Ratnam, S. Ramarad, H. Siddiqui, M. E. Hoque, *Mater. Sci. Eng., C* **2016**, 67, 792.
- [17] T. M. Keaveny, E. F. Morgan, O. C. Yeh, Bone mechanics, in *Standard handbook of biomedical engineering and design*, (Ed. M. Kutz), Ch. 8, McGRAW-HILL, New York **2003**.
- [18] K. A. Hing, *Phil. Trans. R. Soc. A* **2004**, 362, 2821.
- [19] R. Y. Basha, T. S. S. Kumar, M. Doble, *Mater. Sci. Eng., C* **2015**, 57, 452.
- [20] A. Shavandi, A. E.-D. A. Bekhit, Z. F. Sun, A. Ali, *JBBBE* **2015**, 25, 98.
- [21] a) A. J. Wagoner Johnson, B. A. Herschler, *Acta Biomater.* **2011**, 7, 16; b) G. E. J. Poinern, R. K. Brundavanam, D. Fawcett, *Am. J. Biomed. Eng.* **2013**, 3, 148.
- [22] T. G. Kim, H. Shin, D. W. Lim, *Adv. Funct. Mater.* **2012**, 22, 2446.

- [23] a) T. Kaur, A. Thirugnanam, *RSC Adv.* **2016**, 6, 39982; b) C. Van Blitterswijk, J. De Boer, *Tissue Engineering*, Elsevier Science, **2014**.
- [24] M. M. Stevens, *Mater. Today* **2008**, 11, 18.
- [25] J. Malda, J. Visser, F. P. Melchels, T. Jüngst, W. E. Hennink, W. J. A. Dhert, J. Groll, D. W. Hutmacher, *Adv. Mater.* **2013**, 25, 5011.
- [26] L. L. Hench, J. M. Polak, *Science* **2002**, 295, 1014.
- [27] R. Murugan, S. Ramakrishna, *Compos. Sci. Technol.* **2005**, 65, 2385.
- [28] F. Witte, V. Kaese, H. Haferkamp, E. Switzer, A. Meyer-Lindenberg, C. J. Wirth, H. Windhagen, *Biomaterials* **2005**, 26, 3557.
- [29] K. Y. Chiu, M. H. Wong, F. T. Cheng, H. C. Man, *Surf. Coat. Technol.* **2007**, 202, 590.
- [30] a) U. Kalsoom, P. N. Nesterenko, B. Paull, *RSC Adv.* **2016**, 6, 60355; b) S. Christ, M. Schnabel, E. Vorndran, J. Groll, U. Gbureck, *Mater. Lett.* **2015**, 139, 165.
- [31] S. Stankovich, D. A. Dikin, G. H. B. Dommett, K. M. Kohlhaas, E. J. Zimney, E. A. Stach, R. D. Piner, S. T. Nguyen, R. S. Ruoff, *Nature* **2006**, 442, 282.
- [32] a) D. Puppi, C. Mota, M. Gazzarri, D. Dinucci, A. Gloria, M. Myrzabekova, L. Ambrosio, F. Chiellini, *Biomed. Microdevices* **2012**, 14, 1115; b) J.-H. Shim, J.-Y. Won, S.-J. Sung, D.-H. Lim, W.-S. Yun, Y.-C. Jeon, J.-B. Huh, *Polymers* **2015**, 7, 2061; c) J. Zhang, S. Zhao, M. Zhu, Y. Zhu, Y. Zhang, Z. Liu, C. Zhang, *J. Mater. Chem. B* **2014**, 2, 7583.
- [33] a) S. Govender, C. Csimma, H. K. Genant, A. Valentin-Opran, Y. Amit, R. Arbel, H. Aro, D. Atar, M. Bishay, M. G. Börner, P. Chiron, P. Choong, J. Cinats, B. Courtenay, R. Feibel, B. Geulette, C. Gravel, N. Haas, M. Raschke, E. Hammacher, D. van der Velde, P. Hardy, M. Holt, C. Josten, R. L. Ketterl, B. Lindeque, G. Lob, H. Mathevon, G. McCoy, D. Marsh, R. Miller, E. Munting, S. Oevre, L. Nordsletten, A. Patel, A. Pohl, W. Rennie, P. Reynders, P. M. Rommens, J. Rondia, W. C. Rossouw, P. J. Daneel, S. Ruff, A. Rüter, S. Santavirta, T. A. Schildhauer, C. Gekle, R. Schnettler, D. Segal, H. Seiler, R. B. Snowdowne, J. Stapert, G. Taglang, R. Verdonk, L. Vogels, A. Weckbach, A. Wentzensen, T. Wisniewski, *J. Bone Joint Surg. Am.* **2002**, 84, 2123; b) G. E. Friedlaender, C. R. Perry, J. Dean Cole, S. D. Cook, G. Cierny, G. F. Muschler, G. A. Zych, J. H. Calhoun, A. J. Laforte, S. Yin, *J. Bone Joint Surg. Am.* **2001**, 83, S151.
- [34] Y. Hamada, K. Nokihara, M. Okazaki, W. Fujitani, T. Matsumoto, M. Matsuo, Y. Umakoshi, J. Takahashi, N. Matsuura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, 310, 153.
- [35] a) A. English, A. Azeem, K. Spanoudes, E. Jones, B. Tripathi, N. Basu, K. McNamara, S. A. M. Tofail, N. Rooney, G. Riley, A. O'Riordan, G. Cross, D. Hutmacher, M. Biggs, A. Pandit, D. I. Zeugolis, *Acta Biomater.* **2015**, 27, 3; b) A. Azeem, A. English, P. Kumar, A. Satyam, M. Biggs, E. Jones, B. Tripathi, N. Basu, J. Henkel, C. Vaquette, N. Rooney, G. Riley, A. O'Riordan, G. Cross, S. Ivanovski, D. W. Hutmacher, A. Pandit, D. Zeugolis, *Nanomedicine* **2015**, 10, 693.
- [36] a) S. V. Murphy, A. Atala, *Nat. Biotechnol.* **2014**, 32, 773; b) C. R. Thoma, M. Zimmermann, I. Agarkova, J. M. Kelm, W. Krek, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, 69–70, 29; c) D. W. Hutmacher, *Nat. Mater.* **2010**, 9, 90.
- [37] J. C. Reichert, S. Saifzadeh, M. E. Wullschleger, D. R. Epari, M. A. Schütz, G. N. Duda, H. Schell, M. van Griensven, H. Redl, D. W. Hutmacher, *Biomaterials* **2009**, 30, 2149.



- [38] F. Zhao, Y. Yin, W. W. Lu, J. C. Leong, W. Zhang, J. Zhang, M. Zhang, K. Yao, *Biomaterials* **2002**, *23*, 3227.
- [39] M. Gelinsky, P. B. Welzel, P. Simon, A. Bernhardt, U. König, *Chem. Eng. J.* **2008**, *137*, 84.
- [40] a) P. J. Ginty, D. Howard, F. R. Rose, M. J. Whitaker, J. J. Barry, P. Tighe, S. R. Mutch, G. Serhatkulu, R. O. Oreffo, S. M. Howdle, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 7426; b) N. Hüsing, U. Schubert, *Angew. Chem.* **1998**, *110*, 22.
- [41] J. J. Yoon, J. H. Kim, T. G. Park, *Biomaterials* **2003**, *24*, 2323.
- [42] F. Guillemot, A. Souquet, S. Catros, B. Guillotin, J. Lopez, M. Faucon, B. Pippenger, R. Bareille, M. Rémy, S. Bellance, *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 2494.
- [43] a) K. Arcaute, B. K. Mann, R. B. Wicker, *Ann. Biomed. Eng.* **2006**, *34*, 1429; b) N. E. Fedorovich, J. R. De Wijn, A. J. Verbout, J. Alblas, W. J. Dhert, *Tissue Eng. Part A* **2008**, *14*, 127.
- [44] K. Virginie, G. Fabien, A. Isabelle, G. Bertrand, M. Sylvain, A. Joëlle, F. Jean-Christophe, C. Sylvain, *Biofabrication* **2010**, *2*, 014101.
- [45] G. C. Engelmayr, M. Cheng, C. J. Bettinger, J. T. Borenstein, R. Langer, L. E. Freed, *Nat. Mater.* **2008**, *7*, 1003.
- [46] A. Kumar, K. C. Nune, L. E. Murr, R. D. K. Misra, *Int. Mater. Rev.* **2016**, *61*, 20.
- [47] M. Biggs, A. Pandit, D. I. Zeugolis, *Nanomedicine* **2016**, *11*, 989.
- [48] a) L. Huang, K. Nagapudi, R. P. Apkarian, E. L. Chaikof, *J. Biomat. Sci. Polym. E.* **2001**, *12*, 979; b) D. H. Reneker, I. Chun, *Nanotechnology* **1996**, *7*, 216.
- [49] a) Y. Huang, N. Bu, Y. Duan, Y. Pan, H. Liu, Z. Yin, Y. Xiong, *Nanoscale* **2013**, *5*, 12007; b) X. Wang, B. Ding, G. Sun, M. Wang, J. Yu, *Prog. Mater. Sci.* **2013**, *58*, 1173; c) S. Agarwal, A. Greiner, *Polym. Adv. Technol.* **2011**, *22*, 372; d) E. J. Lee, D. H. Kwak, D. J. Kim, *J. Ceram. Process. Res.* **2015**, *16*, 330.
- [50] D. Sun, C. Chang, S. Li, L. Lin, *Nano Lett.* **2006**, *6*, 839.
- [51] P. D. Dalton, K. Klinkhammer, J. Salber, D. Klee, M. Moller, *Biomacromolecules* **2006**, *7*, 686.
- [52] T. D. Brown, P. D. Dalton, D. W. Hutmacher, *Adv. Mater.* **2011**, *23*, 5651.
- [53] G. Hochleitner, T. Jüngst, T. D. Brown, K. Hahn, C. Moseke, F. Jakob, P. D. Dalton, J. Groll, *Biofabrication* **2015**, *7*, 035002.
- [54] J. Visser, F. P. W. Melchels, J. E. Jeon, E. M. van Bussel, L. S. Kimpton, H. M. Byrne, W. J. A. Dhert, P. D. Dalton, D. W. Hutmacher, J. Malda, *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 6933.
- [55] a) V. Mironov, R. P. Visconti, V. Kasyanov, G. Forgacs, C. J. Drake, R. R. Markwald, *Biomaterials* **2009**, *30*, 2164; b) M. S. Mannoor, Z. Jiang, T. James, Y. L. Kong, K. A. Malatesta, W. O. Soboyejo, N. Verma, D. H. Gracias, M. C. McAlpine, *Nano Lett.* **2013**, *13*, 2634.
- [56] a) C. Vaquette, W. Fan, Y. Xiao, S. Hamlet, D. W. Hutmacher, S. Ivanovski, *Biomaterials* **2012**, *33*, 5560; b) S. H. Park, T. G. Kim, H. C. Kim, D.-Y. Yang, T. G. Park, *Acta Biomater.* **2008**, *4*, 1198.
- [57] a) L. Elomaa, C. C. Pan, Y. Shanjani, A. Malkovskiy, J. V. Seppälä, Y. Yang, *J. Mater. Chem. B* **2015**, *3*, 8348; b) F. P. W. Melchels, M. A. N. Domingos, T. J. Klein, J. Malda, P. J. Bartolo, D. W. Hutmacher, *Prog. Polym. Sci.* **2012**, *37*, 1079.
- [58] B. K. Gu, D. J. Choi, S. J. Park, M. S. Kim, C. M. Kang, C.-H. Kim, *Biomater. Res.* **2016**, *20*, 1.
- [59] W. Zhu, X. Ma, M. Gou, D. Mei, K. Zhang, S. Chen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **2016**, *40*, 103.

- [60] B. L. Farrugia, T. D. Brown, Z. Upton, D. W. Hutmacher, P. D. Dalton, T. R. Dargaville, *Biofabrication* **2013**, 5, 11.
- [61] a) M. P. Chhaya, E. R. Balmayor, D. W. Hutmacher, J.-T. Schantz, *Sci. Rep.* **2016**, 6, 28030; b) M. L. Muerza-Cascante, D. Haylock, D. W. Hutmacher, P. D. Dalton, *Tissue Eng. Part B* **2014**, 21, 187.
- [62] P. W. Atkins, *Physikalische Chemie*, Wiley-VCH, Weinheim **2001**.
- [63] W. Ostwald, *Die Welt der vernachlässigten Dimensionen*, Verlag Theodor Steinkopff, Dresden, Leipzig **1914**.
- [64] T. Hofmann, *Chem. unserer Zeit* **2004**, 38, 24.
- [65] O. W. Harald F. Krug, in Römpp Online: *Nanopartikel*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart **2011**.
- [66] C. V. Leal, D. S. T. Martinez, B. A. Más, O. L. Alves, E. A. R. Duek, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, 59, 547.
- [67] C. Stutz, I. Bilecka, A. F. Thunemann, M. Niederberger, H. G. Börner, *Chem. Comm.* **2012**, 48, 7176.
- [68] M. R. D. Zitoun, M. C. Fromen, M. J. Casanove, P. Lecante, C. Amiens, B. Chaudret, *Phys. Rev. Lett.* **2002**, 89, 4.
- [69] a) E. C. K. L. Kelly, L. L. Zhao, G. C. Schatz, *J. Phys. Chem. B* **2003**, 107, 668; b) F. Fischer, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2012**.
- [70] H. Weller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1993**, 32, 41.
- [71] K. M. Mullaugh, G. W. Luther, *J. Nanopart. Res.* **2011**, 13, 393.
- [72] S. Sepeur, N. Laryea, S. Goedicke, F. Gross, *Nanotechnologie*, Vincentz Network, Hannover **2008**.
- [73] a) B. Derjaguin, L. D. Landau, *Zh. Eksp. Teor. Fiz.* **1945**, 15, 663; b) E. J. W. Verwey, J. T. G. Overbeek, *Theory of the Stability of Lyophobic Colloids*, Elsevier, Amsterdam **1948**.
- [74] H. Schmidt, *Appl. Organomet. Chem.* **2001**, 15, 331.
- [75] T. E. M. Alexander Kraynov, Concepts for the Stabilization of Metal Nanoparticles in Ionic Liquids, in *Applications of Ionic Liquids in Science and Technology*, (Ed. S. Handy), Ch. 12, InTech, Published online **2011**.
- [76] a) R. Tantra, J. Tompkins, P. Quincey, *Coll. Surf. B* **2010**, 75, 275; b) S. H. Brewer, W. R. Glomm, M. C. Johnson, M. K. Knag, S. Franzen, *Langmuir* **2005**, 21, 9303; c) N. Saleh, T. Phenrat, K. Sirk, B. Dufour, J. Ok, T. Sarbu, K. Matyjaszewski, R. D. Tilton, G. V. Lowry, *Nano Lett.* **2005**, 5, 2489.
- [77] a) K. C. Vrancken, P. Van Der Voort, K. Possemiers, E. F. Vansant, *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, 174, 86; b) F. Bauer, H.-J. Gläsel, U. Decker, H. Ernst, A. Freyer, E. Hartmann, V. Sauerland, R. Mehnert, *Prog. Org. Coat.* **2003**, 47, 147.
- [78] a) C. Fritz, G. Scholz, M. Feist, E. Kemnitz, *Dalton Trans.* **2012**, 41, 11351; b) J. Noack, F. Emmerling, H. Kirmse, E. Kemnitz, *J. Mater. Chem.* **2011**, 21, 15015; c) Z. Xu, C. Shen, Y. Hou, H. Gao, S. Sun, *Chem. Mater.* **2009**, 21, 1778.
- [79] a) J. Hang, L. Shi, X. Feng, L. Xiao, *Powder Technol.* **2009**, 192, 166; b) G. Fritz, V. Schädler, N. Willenbacher, N. J. Wagner, *Langmuir* **2002**, 18, 6381; c) M. S. Romero-Cano, A. Martín-Rodríguez, F. J. de las Nieves, *Langmuir* **2001**, 17, 3505.
- [80] a) S. C. G. Leeuwenburgh, I. D. Ana, J. A. Jansen, *Acta Biomater.* **2010**, 6, 836; b) L. Y. J. L. X. Jiang, L. J. Xu, C. T. Han, C. D. Xiong, *eXPRESS Polym. Lett.* **2014**, 8, 133.
- [81] K. Rezwan, Q. Z. Chen, J. J. Blaker, A. R. Boccaccini, *Biomaterials* **2006**, 27, 3413.
- [82] M. Ebelmen, *Ann. Chim. Phys.* **1846**, 16, 129.

- [83] L. L. Hench, J. K. West, *Chem. Rev.* **1990**, 90, 33.
- [84] E. Kemnitz, U. Groß, S. Rüdiger, C. S. Shekar, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2003**, 42, 4251.
- [85] a) F. Chi, G. Wei, Q. Zhang, X. Sun, L. Zhang, X. Lu, L. Wang, F. Yi, X. Gao, *Appl. Surf. Sci.*, 356, 593; b) D. Bernsmeier, J. Polte, E. Ortel, T. Krah, E. Kemnitz, R. Kraehnert, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, 6, 19559; c) K. Scheurell, E. Kemnitz, P. Garcia-Juan, J. Eicher, B. Lintner, J. Hegmann, R. Jahn, T. Hofmann, P. Löbmann, *J. Sol-Gel Sci. Technol.* **2015**, 76, 82.
- [86] a) E. Kemnitz, *Catal. Sci. Technol.* **2015**, 5, 786; b) J. Krishna Murthy, U. Gross, S. Rüdiger, E. Kemnitz, *Appl. Catal., A* **2004**, 278, 133; c) A. Nego, S. Wuttke, E. Kemnitz, D. Macovei, V. I. Parvulescu, C. M. Teodorescu, S. M. Coman, *Angew. Chem.* **2010**, 122, 8311.
- [87] M. Karg, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2015**.
- [88] a) A. Rehmer, K. Scheurell, E. Kemnitz, *J. Mater. Chem. C* **2015**, 3, 1716; b) T. Krah, Bro, K. Scheurell, B. Lintner, E. Kemnitz, *J. Mater. Chem. C* **2016**, 4, 1454.
- [89] a) W. Posthumus, P. C. M. M. Magusin, J. C. M. Brokken-Zijp, A. H. A. Tinnemans, R. van der Linde, *J. Colloid Interface Sci.* **2004**, 269, 109; b) P. V. D. V. K.C. Vrancken, K. Possemiers, E.F. Vansant, *J. Colloid Interface Sci.* **1995**, 174, 86.
- [90] a) M. Lomoschitz, H. Peterlik, G. Friedbacher, U. Schubert, *J. Mater. Chem.* **2009**, 19, 75; b) G. Guerrero, P. H. Mutin, A. Vioux, *Chem. Mater.* **2000**, 12, 1268; c) M. M. Demir, K. Koynov, Ü. Akbey, C. Bubeck, I. Park, I. Lieberwirth, G. Wegner, *Macromolecules* **2007**, 40, 1089.
- [91] J. Noack, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2011**.
- [92] J. Krishna Murthy, U. Groß, S. Rüdiger, E. Kemnitz, J. M. Winfield, *J. Solid State Chem.* **2006**, 179, 739.
- [93] a) H. Krüger, E. Kemnitz, A. Hertwig, U. Beck, *Thin Solid Films* **2008**, 516, 4175; b) H. Krüger, E. Kemnitz, A. Hertwig, U. Beck, *Phys. Status Solidi A* **2008**, 205, 821.
- [94] Merck KGaA, *Material Safety Data Sheet - Magnesiumfluorid*, Darmstadt **2010**.
- [95] a) J. Lellouche, A. Friedman, J.-P. Lellouche, A. Gedanken, E. Banin, *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* **2012**, 8, 702; b) E. Gentleman, M. M. Stevens, R. G. Hill, D. S. Brauer, *Acta Biomater.* **2013**, 9, 5771.
- [96] a) M. A. Woodruff, D. W. Hutmacher, *Prog. Polym. Sci.* **2010**, 35, 1217; b) A. J. Harmata, C. L. Ward, K. J. Zienkiewicz, J. C. Wenke, S. A. Guelcher, *J. Mater. Res.* **2014**, 29, 2398.
- [97] a) L. D. Unsworth, H. Sheardown, J. L. Brash, *Langmuir* **2008**, 24, 1924; b) J. Herzberger, K. Niederer, H. Pohl, J. Seiwert, M. Worm, F. R. Wurm, H. Frey, *Chem. Rev.* **2015**, 116, 2170; c) T. Jüngst, W. Smolan, K. Schacht, T. Scheibel, J. Groll, *Chem. Rev.* **2015**, 116, 1496.
- [98] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castaño, J. A. Planell, *J. R. Soc. Interface* **2008**, 5, 1137.
- [99] J. K. Carrow, P. Kerativitayanan, M. K. Jaiswal, G. Lokhande, A. K. Gaharwar, Polymers for Bioprinting, in *Essentials of 3D Biofabrication and Translation*, (Eds. A. Atala, J. J. Yoo), Ch. 13, Academic Press Elsevier, Oxford **2015**.
- [100] R. Smeets, M. Barbeck, H. Hanken, H. Fischer, M. Lindner, M. Heiland, M. Wöltje, S. Ghanaati, A. Kolk, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2016**, doi: 10.1002/jbm.b.33660.

- [101] E. Kemnitz; NANOFLUOR GmbH (Berlin, DE). Calcium fluoride sol and optically active surface coating derived thereof. United States Patent 20150322269. 12. November **2015**.
- [102] W. Klauck, J. Klein, L. Duhm, W. Maier; Henkel Kommanditgesellschaft Auf Aktien. Cyanacrylate adhesive with ester and polymer additives. United States Patent US6617385 B1. 9. September **2003**.
- [103] S. Spange, S. Wolf, F. Simon, Adsorption of Poly(vinyl formamide-co-vinyl amine) (PVFA-co-PVAm) onto Metal Surfaces, in *Characterization of Polymer Surfaces and Thin Films*, Vol. 132 (Eds. K. Grundke, M. Stamm, H.-J. Adler), Ch. 23, Springer Berlin Heidelberg, **2006**.
- [104] a) B. Chang, M. Zhang, G. Qing, T. Sun, *Small* **2015**, *11*, 1097; b) M. D. Mager, V. LaPointe, M. M. Stevens, *Nat. Chem.* **2011**, *3*, 582.
- [105] a) M. Zhang, G. Qing, C. Xiong, R. Cui, D. W. Pang, T. Sun, *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 749; b) J.-R. Woo, D.-K. Lim, J.-M. Nam, *Small* **2011**, *7*, 648; c) G. Palui, F. Aldeek, W. Wang, H. Mattoussi, *Chem. Soc. Rev.* **2015**, *44*, 193.
- [106] a) M. M. Yallapu, N. Chauhan, S. F. Othman, V. Khalilzad-Sharghi, M. C. Ebeling, S. Khan, M. Jaggi, S. C. Chauhan, *Biomaterials* **2015**, *46*, 1; b) M.-C. Sin, W.-L. Lin, J. Chang-Hung Chen, A. Higuchi, J. Zheng, A. Chinnathambi, S. A. Alharbi, Y. Chang, *Int. J. Polym. Mater.* **2016**, *65*, 409.
- [107] U. O. S. Seker, H. V. Demir, *Molecules* **2011**, *16*, 1426.
- [108] a) F. Wang, X. Liu, C.-H. Lu, I. Willner, *ACS Nano* **2013**, *7*, 7278; b) T. Wang, J. Mitchell, H. Börner, H. Cölfen, M. Antonietti, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2010**, *12*, 11984; c) N. Poulsen, M. Sumper, N. Kröger, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2003**, *100*, 12075.
- [109] a) Y. Shen, G. Li, Y. Ma, D. Yu, J. Sun, Z. Li, *Soft Matter* **2015**, *11*, 7502; b) K. Baranes, H. Moshe, N. Alon, S. Schwartz, O. Shefi, *ACS Chem. Neurosci.* **2014**, *5*, 370.
- [110] C. D. Fjell, J. A. Hiss, R. E. W. Hancock, G. Schneider, *Nat. Rev. Drug Discovery* **2012**, *11*, 37.
- [111] E. F. Banwell, E. S. Abelardo, D. J. Adams, M. A. Birchall, A. Corrigan, A. M. Donald, M. Kirkland, L. C. Serpell, M. F. Butler, D. N. Woolfson, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 596.
- [112] a) B. D. Briggs, M. R. Knecht, *J. Phys. Chem. Lett.* **2012**, *3*, 405; b) S. Brown, *Nat. Biotechnol.* **1997**, *15*, 269.
- [113] G. Smith, *Science* **1985**, *228*, 1315.
- [114] a) B. P. Gray, K. C. Brown, *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 1020; b) G. P. Smith, V. A. Petrenko, *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 391.
- [115] D. J. H. Gaskin, K. Starck, E. N. Vulfson, *Biotechnol. Lett* **2000**, *22*, 1211.
- [116] a) Z. Bazhan, F. E. Ghodsi, J. Mazloom, *Bull. Mater. Sci.* **2013**, *36*, 899; b) K. H. Yoon, J. S. Noh, C. H. Kwon, M. Muhammed, *Mater. Chem. Phys.* **2006**, *95*, 79.
- [117] a) T. T. Trinh, C. Laure, J.-F. Lutz, *Macromol. Chem. Phys.* **2015**, *216*, 1498; b) N. ten Brummelhuis, S. Wieczorek, P. Wilke, T. Schwemmer, H. G. Börner, Peptide-Polymer Conjugates as Model Systems To Explore the Functional Space of Precision Polymers, in *Sequence-Controlled Polymers: Synthesis, Self-Assembly, and Properties*, Vol. 1170 (Eds. J.-F. Lutz, T. Y. Meyer, M. Ouchi, M. Sawamoto), Ch. 4, ACS Publications, Washington DC **2014**.

- [118] a) R. Lévy, N. T. K. Thanh, R. C. Doty, I. Hussain, R. J. Nichols, D. J. Schiffrin, M. Brust, D. G. Fernig, *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 10076; b) J. Y. T. Chong, X. Mulet, B. J. Boyd, C. J. Drummond, *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16*, 205.
- [119] M. Gungormus, H. Fong, I. W. Kim, J. S. Evans, C. Tamerler, M. Sarikaya, *Biomacromolecules* **2008**, *9*, 966.
- [120] P. D. Jadzinsky, G. Calero, C. J. Ackerson, D. A. Bushnell, R. D. Kornberg, *Science* **2007**, *318*, 430.
- [121] J. M. Kogot, A. M. Parker, J. Lee, M. Blaber, G. F. Strouse, T. M. Logan, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 2106.
- [122] a) F. Dubois, B. Mahler, B. Dubertret, E. Doris, C. Mioskowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2007**, *129*, 482; b) J. Jayabharathi, M. Sundharesan, A. Prabhakaran, C. Karunakaran, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 9518; c) H. Sun, M. Ai, S. Zhu, X. Jia, Q. Cai, X. Yang, *RSC Adv.* **2015**, *5*, 95631.
- [123] a) S. R. Whaley, D. S. English, E. L. Hu, P. F. Barbara, A. M. Belcher, *Nature* **2000**, *405*, 665; b) T. Serizawa, H. Matsuno, T. Sawada, *J. Mater. Chem.* **2011**, *21*, 10252.
- [124] M. D. Roy, S. K. Stanley, E. J. Amis, M. L. Becker, *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 1830.
- [125] H. S. Kim, *Mater. Sci. Eng., A* **2000**, *289*, 30.
- [126] P. Fratzl, I. Burgert, H. S. Gupta, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2004**, *6*, 5575.
- [127] a) Y.-X. Yan, H.-B. Yao, S.-H. Yu, *Adv. Mater. Interfaces* **2016**, doi: 10.1002/admi.201600296; b) P. Podsiadlo, A. K. Kaushik, E. M. Arruda, A. M. Waas, B. S. Shim, J. Xu, H. Nandivada, B. G. Pumplín, J. Lahann, A. Ramamoorthy, N. A. Kotov, *Science* **2007**, *318*, 80.
- [128] J. Currey, *Nature* **2001**, *414*, 699.
- [129] J. B. Thompson, J. H. Kindt, B. Drake, H. G. Hansma, D. E. Morse, P. K. Hansma, *Nature* **2001**, *414*, 773.
- [130] a) P. Zioupos, J. D. Currey, *J. Mater. Res.* **1994**, *29*, 978; b) D. Vashishth, K. E. Tanner, W. Bonfield, *J. Biomech.* **2000**, *33*, 1169.
- [131] G. E. Fantner, J. Adams, P. Turner, P. J. Thurner, L. W. Fisher, P. K. Hansma, *Nano Lett.* **2007**, *7*, 2491.
- [132] G. E. Fantner, T. Hassenkam, J. H. Kindt, J. C. Weaver, H. Birkedal, L. Pechenik, J. A. Cutroni, G. A. G. Cidade, G. D. Stucky, D. E. Morse, P. K. Hansma, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 612.
- [133] A. A. Poundarik, T. Diab, G. E. Sroga, A. Ural, A. L. Boskey, C. M. Gundberg, D. Vashishth, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2012**, *109*, 19178.
- [134] a) B. Zhao, H. Hu, S. K. Mandal, R. C. Haddon, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 3235; b) W. Guojian, W. Lijuan, Z. Mei, C. Zhengmian, *Compos. Part A Appl. Sci. Manuf.* **2009**, *40*, 1476; c) K. Chi, Z. Zhang, J. Xi, Y. Huang, F. Xiao, S. Wang, Y. Liu, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2014**, *6*, 16312.
- [135] T. Kang, X. Hua, P. Liang, M. Rao, Q. Wang, C. Quan, C. Zhang, Q. Jiang, *Compos. Sci. Technol.* **2016**, *123*, 232.
- [136] a) E. Wang, S.-H. Lee, S.-W. Lee, *Biomacromolecules* **2011**, *12*, 672; b) P. Laaksonen, A. Walther, J.-M. Malho, M. Kainlauri, O. Ikkala, M. B. Linder, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2011**, *50*, 8688.
- [137] a) D. Rothenstein, B. Claasen, B. Omiecienski, P. Lammel, J. Bill, *J. Am. Chem. Soc.* **2012**, *134*, 12547; b) D. D. Laws, H.-M. L. Bitter, A. Jerschow, *Angew. Chem.* **2002**, *114*, 3224; c) Y. Suzuki, H. Shindo, T. Asakura, *J. Phys. Chem. B* **2016**, *120*, 4600; d) P. A. Mirau, R. R. Naik, P. Gehring, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *133*, 18243.

- [138] K.-I. Sano, H. Sasaki, K. Shiba, *Langmuir* **2005**, *21*, 3090.
- [139] F. Hanßke, E. Kemnitz, H. G. Börner, *Small* **2015**, *11*, 4303.
- [140] F. Hanßke, Diplomarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2012**.
- [141] K. S. W. Sing, D. H. Everett, R. A. W. Haul, L. Moscou, R. A. Pierotti, J. Rouquerol, T. Siemieniowska, *Pure Appl. Chem.* **1985**, *57*, 603.
- [142] E. Kemnitz, D.-H. Menz, *Prog. Solid State Chem.* **1998**, *26*, 97.
- [143] J. Noack, C. Fritz, C. Flugel, F. Hemmann, H.-J. Glasel, O. Kahle, C. Dreyer, M. Bauer, E. Kemnitz, *Dalton Trans.* **2013**, *42*, 5706.
- [144] S. Wuttke, S. M. Coman, G. Scholz, H. Kirmse, A. Vimont, M. Daturi, S. L. M. Schroeder, E. Kemnitz, *Chem. Eur. J.* **2008**, *14*, 11488.
- [145] R. L. Willett, K. W. Baldwin, K. W. West, L. N. Pfeiffer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2005**, *102*, 7817.
- [146] T. Schwemmer, J. Baumgartner, D. Faivre, H. G. Börner, *J. Am. Chem. Soc.* **2011**, *134*, 2385.
- [147] U. Hersel, C. Dahmen, H. Kessler, *Biomaterials* **2003**, *24*, 4385.
- [148] M. G. Page, N. Nassif, H. G. Börner, M. Antonietti, H. Cölfen, *Cryst. Growth Des.* **2008**, *8*, 1792.
- [149] J.-M. Nam, Y. Kim, S. M. Ko, *Chem. Asian J.* **2016**, doi: 10.1002/asia.201600236.
- [150] H. G. Börner, *Prog. Polym. Sci.* **2009**, *34*, 811.
- [151] K. Knop, R. Hoogenboom, D. Fischer, U. S. Schubert, *Angew. Chem. Int. Ed.* **2010**, *49*, 6288.
- [152] S. Wuttke, G. Scholz, S. Rüdiger, E. Kemnitz, *J. Mater. Chem.* **2007**, *17*, 4980.
- [153] P. Wilke, H. G. Börner, *ACS Macro Lett.* **2012**, *1*, 871.
- [154] F. Bienwald, Bachelorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2013**.
- [155] a) B. M. Blunden, R. Chapman, M. Danial, H. Lu, K. A. Jolliffe, S. Perrier, M. H. Stenzel, *Chem. Eur. J.* **2014**, *20*, 12745; b) U. O. S. Seker, B. Wilson, S. Dincer, I. W. Kim, E. E. Oren, J. S. Evans, C. Tamerler, M. Sarikaya, *Langmuir* **2007**, *23*, 7895.
- [156] M. Hnilova, E. E. Oren, U. O. S. Seker, B. R. Wilson, S. Collino, J. S. Evans, C. Tamerler, M. Sarikaya, *Langmuir* **2008**, *24*, 12440.
- [157] A. Maslovskis, J. B. Guilbaud, I. Grillo, N. Hodson, A. F. Miller, A. Saiani, *Langmuir* **2014**, *30*, 10471.
- [158] D. Eckhardt, M. Groenewolt, E. Krause, H. G. Börner, *Chem. Comm.* **2005**, *22*, 2814.
- [159] a) P. Wilke, H. G. Börner, *Eur. Polym. J.* **2015**, *62*, 374; b) D. Remmler, Bachelorarbeit, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2012**.
- [160] F. Waltz, M. A. Swider, P. Hoyer, T. Hassel, M. Erne, K. Möhwald, M. Adlung, A. Feldhoff, C. Wickleder, F.-W. Bach, P. Behrens, *J. Mater. Res.* **2012**, *47*, 176.
- [161] V. Samsoninkova, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin, bisher unveröffentlicht. **2017**.
- [162] T. Date, J. Sekine, H. Matsuno, T. Serizawa, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2011**, *3*, 351.
- [163] C. Flügel, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2016**.
- [164] T. Serizawa, T. Sawada, H. Matsuno, *Langmuir* **2007**, *23*, 11127.
- [165] J. L. Zimmermann, T. Nicolaus, G. Neuert, K. Blank, *Nat. Protoc.* **2010**, *5*, 975.
- [166] H. Lee, N. F. Scherer, P. B. Messersmith, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2006**, *103*, 12999.

- [167] S. Lowell, J. E. Shields, M. A. Thomas, M. Thommes, *Micropore Analysis, in Characterization of Porous Solids and Powders: Surface Area, Pore Size and Density*, Ch. 16, Springer Netherlands, Dordrecht **2004**.
- [168] S. Mann, *Nat. Mater.* **2009**, *8*, 781.
- [169] a) E. Ruiz-Hitzky, P. Aranda, M. Darder, M. Ogawa, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 801; b) S. C. Tjong, H. Chen, *Mater. Sci. Eng., R* **2004**, *45*, 1.
- [170] C. Sanchez, P. Belleville, M. Popall, L. Nicole, *Chem. Soc. Rev.* **2011**, *40*, 696.
- [171] a) S. Rüdiger, E. Kemnitz, *Dalton Trans.* **2008**, *9*, 1117; b) E. Kemnitz, S. Ruediger, U. Gross, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **2004**, *630*, 1696.
- [172] a) X. Wang, J. Zhuang, Q. Peng, Y. Li, *Nature* **2005**, *437*, 121; b) T. K. Sau, A. L. Rogach, F. Jäckel, T. A. Klar, J. Feldmann, *Adv. Mater.* **2010**, *22*, 1805.
- [173] E. C. Dreaden, A. M. Alkilany, X. Huang, C. J. Murphy, M. A. El-Sayed, *Chem. Soc. Rev.* **2012**, *41*, 2740.
- [174] a) Z. Wang, B. Tan, I. Hussain, N. Schaeffer, M. F. Wyatt, M. Brust, A. I. Cooper, *Langmuir* **2007**, *23*, 885; b) K. M. Delak, N. Sahai, *Chem. Mater.* **2005**, *17*, 3221.
- [175] T. Schuler, J. Renkel, S. Hobe, M. Susewind, D. E. Jacob, M. Panthofer, A. Hoffmann-Roder, H. Paulsen, W. Tremel, *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 3511.
- [176] E. Kemnitz, J. Noack, *Dalton Trans.* **2015**, *44*, 19411.
- [177] M. Karg, G. Scholz, R. König, E. Kemnitz, *Dalton Trans.* **2012**, *41*, 2360.
- [178] C. Sanchez, H. Arribart, M. M. Giraud Guille, *Nat. Mater.* **2005**, *4*, 277.
- [179] M. Deng, S. G. Kumbar, L. S. Nair, A. L. Weikel, H. R. Allcock, C. T. Laurencin, *Adv. Funct. Mater.* **2011**, *21*, 2641.
- [180] R. A. Perez, S.-J. Seo, J.-E. Won, E.-J. Lee, J.-H. Jang, J. C. Knowles, H.-W. Kim, *Mater. Today* **2015**, *18*, 573.
- [181] N. Maruyama, Y. Shibata, A. Mochizuki, A. Yamada, K. Maki, T. Inoue, R. Kamijo, T. Miyazaki, *Biomaterials* **2015**, *47*, 62.
- [182] F. Hanßke, O. Bas, C. Vaquette, G. Hochleitner, J. Groll, E. Kemnitz, D. W. Hutmacher, H. G. Börner, *J. Mater. Chem. B* **2017**, DOI: 10.1039/C7TB00165G.
- [183] I. Zein, D. W. Hutmacher, K. C. Tan, S. H. Teoh, *Biomaterials* **2002**, *23*, 1169.
- [184] N. Ristovski, N. Bock, S. Liao, S. K. Powell, J. Ren, G. T. S. Kirby, K. A. Blackwood, M. A. Woodruff, *Biointerphases* **2015**, *10*, 011006.
- [185] a) S. Pina, J. M. Oliveira, R. L. Reis, *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 1143; b) L. Wu, F. Feyerabend, A. F. Schilling, R. Willumeit-Römer, B. J. C. Luthringer, *Acta Biomater.* **2015**, *27*, 294; c) L. Pan, X. Shi, S. Liu, X. Guo, M. Zhao, R. Cai, G. Sun, *Toxicol. Lett.* **2014**, *225*, 34; d) W.-J. Qu, D.-B. Zhong, P.-F. Wu, J.-F. Wang, B. Han, *J. Bone Miner. Metab.* **2008**, *26*, 328.
- [186] a) B. Seidt, V. Samsoninkova, F. Hanßke, A. Gjardy, P. Fratzl, H. G. Börner, W. Wagermaier, *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2017**, in preparation; b) B. M. Seidt, Dissertation, Technische Universität Berlin, Berlin **2016**.
- [187] R. O. Ritchie, *Nat. Mater.* **2011**, *10*, 817.
- [188] V. Samsoninkova, B. Seidt, F. Hanßke, W. Wagermaier, H. G. Börner, *Adv. Mater. Interf.* **2017**, *4*, 1600501.
- [189] E. H. Immergut, H. F. Mark, *Principles of Plasticization, in Plasticization and Plasticizer Processes*, Vol. 48, Ch. 1, American Chemical Society, Washington DC **1965**.
- [190] O. Hartman, C. Zhang, E. L. Adams, M. C. Farach-Carson, N. J. Petrelli, B. D. Chase, J. F. Rabolt, *Biomaterials* **2010**, *31*, 5700.

- [191] G. Kister, G. Cassanas, M. Bergounhon, D. Hoarau, M. Vert, *Polymer* **2000**, *41*, 925.
- [192] P. Scherrer, *Göttinger Nachrichten Math. Phys.* **1918**, *2*, 98.
- [193] a) R. A. Horch, N. Shahid, A. S. Mistry, M. D. Timmer, A. G. Mikos, A. R. Barron, *Biomacromolecules* **2004**, *5*, 1990; b) C. H. Kum, Y. Cho, Y. K. Joung, J. Choi, K. Park, S. H. Seo, Y. S. Park, D. J. Ahn, D. K. Han, *J. Mater. Chem. B* **2013**, *1*, 2764.
- [194] C. Vaquette, S. Ivanovski, S. M. Hamlet, D. W. Hutmacher, *Biomaterials* **2013**, *34*, 5538.
- [195] G. B. Sigal, M. Mrksich, G. M. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 3464.
- [196] K. Cai, M. Frant, J. Bossert, G. Hildebrand, K. Liefeth, K. D. Jandt, *Coll. Surf. B* **2006**, *50*, 1.
- [197] a) R. Gentsch, B. Boysen, A. Lankenau, H. G. Börner, *Macromol. Rapid Commun.* **2010**, *31*, 59; b) R. Gentsch, F. Pippig, S. Schmidt, P. Cernoch, J. Polleux, H. G. Börner, *Macromolecules* **2011**, *44*, 453.
- [198] L. Atar-Froyman, A. Sharon, E. I. Weiss, Y. Hour-Haddad, D. Kesler-Shvero, A. J. Domb, R. Pilo, N. Beyth, *Biomaterials* **2015**, *46*, 141.
- [199] M. H. Fernandes, R. Caram, N. Sooraj Hussain, A. C. Mauricio, J. D. Santos, Bonelike® Graft for Regenerative Bone Applications, in *Surgical Tools and Medical Devices*, (Eds. W. Ahmed, J. M. Jackson), Ch. 13, Springer International Publishing, Cham **2016**.
- [200] C. X. Lam, M. M. Savalani, S. H. Teoh, D. W. Hutmacher, *Biomed. Mater.* **2008**, *3*, 034108.
- [201] C. X. F. Lam, S. H. Teoh, D. W. Hutmacher, *Polym. Int.* **2007**, *56*, 718.
- [202] P. S. Poh, D. W. Hutmacher, M. M. Stevens, M. A. Woodruff, *Biofabrication* **2013**, *5*, 045005.
- [203] a) J. Ren, K. A. Blackwood, A. Doustgani, P. P. Poh, R. Steck, M. M. Stevens, M. A. Woodruff, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2014**, *102*, 3140; b) S.-H. Shin, O. Purevdorj, O. Castano, J. A. Planell, H.-W. Kim, *J. Tissue Eng.* **2012**, *3*, 2041731412443530.
- [204] P. F. Costa, D. W. Hutmacher, C. Theodoropoulos, M. E. Gomes, R. L. Reis, C. Vaquette, *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 864.
- [205] a) P. V. Kersten-Thiele, Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen **2011**; b) K. K. Würzler, Dissertation, Julius-Maximilians-Universität Würzburg, Würzburg **2004**.
- [206] A. Piattelli, A. Scarano, M. Corigliano, M. Piattelli, *Biomaterials* **1996**, *17*, 1443.
- [207] F. A. Probst, D. W. Hutmacher, D. F. Müller, H. G. Machens, J. T. Schantz, *Handchir. Mikrochir. P.* **2010**, *42*, 369.
- [208] C. J. Damien, J. R. Parsons, *J. Appl. Biomater.* **1991**, *2*, 187.
- [209] C. Capone, L. Di Landro, F. Inzoli, M. Penco, L. Sartore, *Polym. Eng. Sci.* **2007**, *47*, 1813.
- [210] a) B. Azhdar, B. Stenberg, L. Kari, *Polym. Compos.* **2008**, *29*, 252; b) Y. Gao, J. Lim, Y. Han, M. Chong, S. H. Teoh, C. Xu, *Nanoscale* **2016**, *8*, 2568.
- [211] J. Lim, M. S. K. Chong, J. K. Y. Chan, S.-H. Teoh, *Small* **2014**, *10*, 2495.
- [212] a) W. Baur, *Acta Crystallogr.* **1956**, *9*, 515; b) M. E. Fleet, X. Liu, P. L. King, *Am. Mineral.* **2004**, *89*, 1422.
- [213] a) I. Armentano, M. Dottori, E. Fortunati, S. Mattioli, J. M. Kenny, *Polym. Degrad. Stab.* **2010**, *95*, 2126; b) J. Idaszek, T. Brynk, J. Jaroszewicz, F. Vanmeert, A. Bruinink, W. Świążkowski, *Polym. Compos.* **2015**, doi: 10.1002/pc.23825.



- [214] J. Zernik, K. Twarog, W. B. Upholt, *Differentiation* **1990**, 44, 207.
- [215] T. Komori, Regulation of Osteoblast Differentiation by Runx2, in *Osteoimmunology: Interactions of the Immune and skeletal systems II*, (Ed. Y. Choi), Ch. 5, Springer US, Boston, MA **2010**.
- [216] a) U. Meyer, H. P. Wiesmann, *Bone and Cartilage Engineering*, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg **2006**; b) J. D. Termine, H. K. Kleinman, S. W. Whitson, K. M. Conn, M. L. McGarvey, G. R. Martin, *Cell* **1981**, 26, 99.
- [217] A. Tarze, A. Deniaud, M. Le Bras, E. Maillier, D. Molle, N. Larochette, N. Zamzami, G. Jan, G. Kroemer, C. Brenner, *Oncogene* **2006**, 26, 2606.
- [218] B. Rai, K. H. Ho, Y. Lei, K.-M. Si-Hoe, C.-M. Jeremy Teo, K. b. Yacob, F. Chen, F.-C. Ng, S. H. Teoh, *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2007**, 65, 2195.
- [219] a) Y.-H. Leem, K.-S. Lee, J.-H. Kim, H.-K. Seok, J.-S. Chang, D.-H. Lee, *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2014**, 10, E527; b) S. Yoshizawa, A. Brown, A. Barchowsky, C. Sfeir, *Acta Biomater.* **2014**, 10, 2834.
- [220] M. Domingos, D. Dinucci, S. Cometa, M. Alderighi, P. J. Bártolo, F. Chiellini, *Int. J. Biomater.* **2009**, 2009, 9.
- [221] G. Hochleitner, J. F. Hümmer, R. Luxenhofer, J. Groll, *Polymer* **2014**, 55, 5017.
- [222] G. Hochleitner, A. Youssef, A. Hrynevich, N. Haigh Jodie, T. Jungst, J. Groll, D. Dalton Paul, *BioNanoMaterials* **2016**, doi: 10.1515/bnm-2015-0022.
- [223] a) P. L. Hansen, J. A. Cohen, R. Podgornik, V. A. Parsegian, *Biophys. J.* **2003**, 84, 350; b) A. K. Kenworthy, K. Hristova, D. Needham, T. J. McIntosh, *Biophys. J.* **1995**, 68, 1921.
- [224] G. Zhang, X. Li, M. Jiang, C. Wu, *Langmuir* **2000**, 16, 9205.
- [225] V. Crescenzi, G. Manzini, G. Calzolari, C. Borri, *Eur. Polym. J.* **1972**, 8, 449.
- [226] K. O'Donoghue, J. Chan, *Curr. Stem Cell Res. Ther.* **2006**, 1, 371.
- [227] M. S. K. Chong, J. Lim, J. Goh, M. W. Sia, J. K. Y. Chan, S. H. Teoh, *Mol. Pharmaceutics* **2014**, 11, 2126.
- [228] H. Zhang, C.-Y. Lin, S. J. Hollister, *Biomaterials* **2009**, 30, 4063.
- [229] Z.-Y. Zhang, S.-H. Teoh, M. S. K. Chong, J. T. Schantz, N. M. Fisk, M. A. Choolani, J. Chan, *Stem Cells* **2009**, 27, 126.
- [230] W. C. Oliver, G. M. Pharr, *J. Mater. Res.* **2004**, 19, 3.
- [231] Protein Calculator v3.4, <http://protcalc.sourceforge.net/>, letztes Update: 13.05.2013, Zugriff: 27.07.2016 um 14:53 Uhr.
- [232] K. K. Gupta, A. Kundan, P. K. Mishra, P. Srivastava, S. Mohanty, N. K. Singh, A. Mishra, P. Maiti, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, 14, 12844.
- [233] a) H. Krüger, Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin, Berlin **2009**; b) P. Ericsson, S. Bengtsson, U. Södervall, *J. Appl. Phys.* **1995**, 78, 3472.
- [234] J. Morfill, K. Blank, C. Zahnd, B. Luginbühl, F. Kühner, K.-E. Gottschalk, A. Plückthun, H. E. Gaub, *Biophys. J.* **2007**, 93, 3583.
- [235] J. N. Milstein, J.-C. Meiners, in *Encyclopedia of Biophysics: Worm-Like Chain (WLC) Model*, (Ed. G. C. K. Roberts), Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg **2013**.
- [236] L. Schmidt, F. Emmerling, H. Kirmse, E. Kemnitz, *RSC Adv.* **2014**, 4, 32.



## 8 Anhang

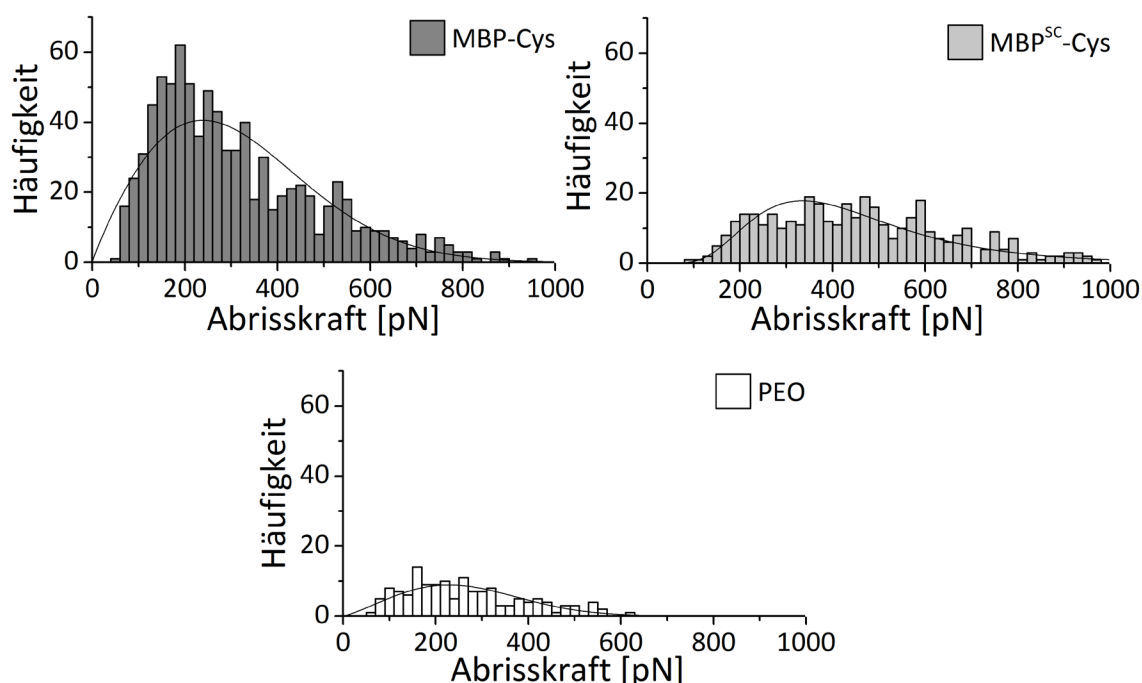


Abbildung A1: Histogramme der SMFS-Abrissereignisse von MBP-Cys (oben links), MBP<sup>SC</sup>-Cys (oben rechts) und reinem PEO (unten) auf MgF<sub>2</sub>-beschichteten Wafern unter. Die Häufigkeiten sind in gleicher Skalierung aufgetragen, um die Unterschiede der Wechselwirkungsfrequenzen deutlich zu machen. (Bedingungen: Messungen in Wasser bei 1.0  $\mu\text{m s}^{-1}$ , Wechselwirkungsfrequenz = relative Häufigkeit der erfolgreichen Abrissereignisse verglichen mit der Gesamtzahl der Annäherungszyklen).

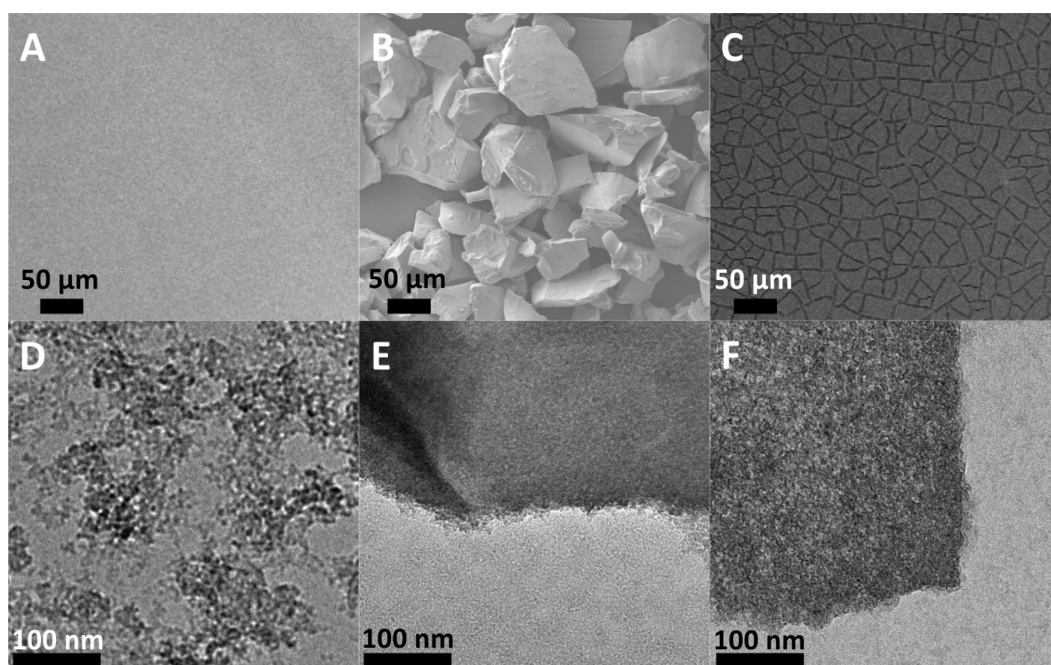
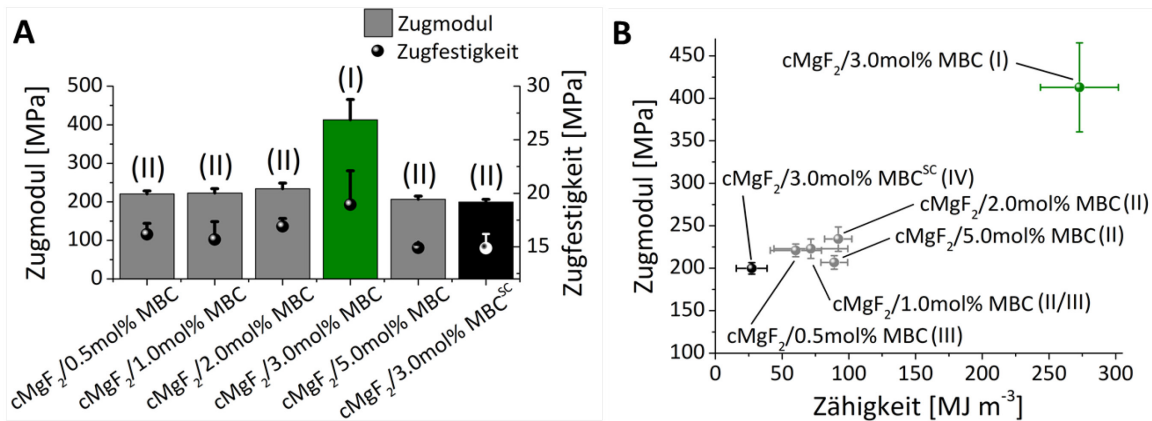
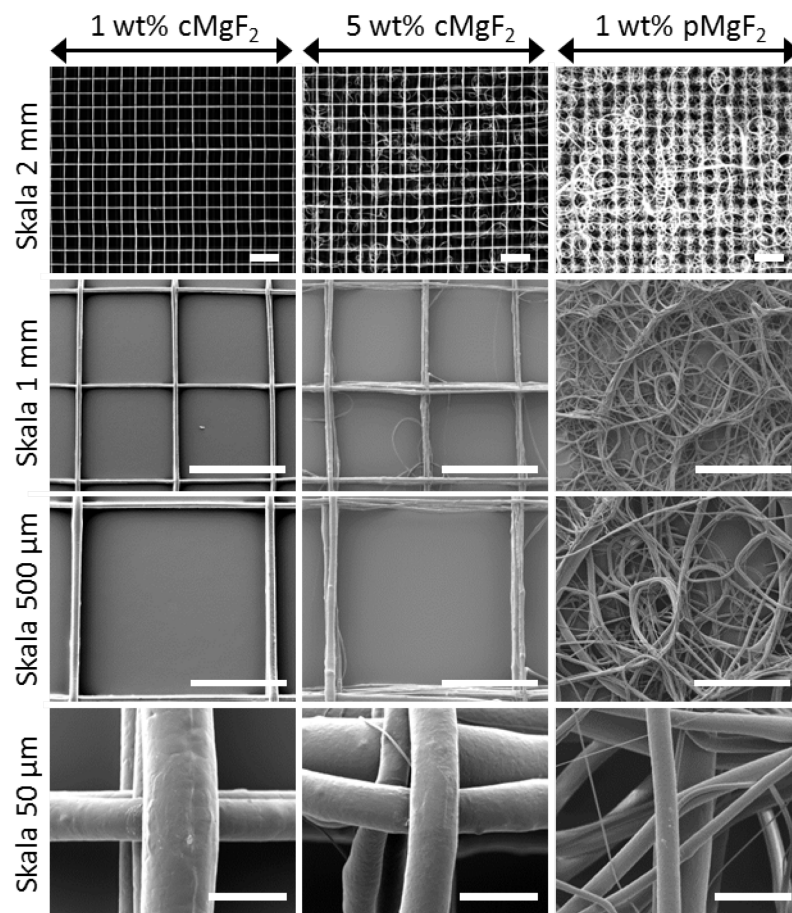


Abbildung A2: Mikroskopischer Vergleich der redispergierten Xerogele aus Methanol: (A-C) SEM- und (D-F) TEM-Aufnahmen mit Zugabe von (A,E) 0.5 mol% MBC, (B,E) TFA und (C,F) ohne Zusätze. (A) Auf Grund unzureichender Auflösung sind keine Partikel erkennbar, aber die TEM-Aufnahme zeigt in (E) lose verbundene Agglomerate, die redispergierbar waren. (B) SEM-Aufnahmen von 16 mol% TFA-stabilisiertem MgF<sub>2</sub> wies große, irreversible Agglomeraten auf. (C,F) Nicht-stabilisiertes Sol trocknete zu einer dichten Agglomerat-Schicht, die Trocknungsrisse aufwies.



**Abbildung A3: Mechanische Verstärkung von kompatibilisierten Kompositen, Variation der Kompatibilisatorkonzentration in mol% relativ zu n(MgF<sub>2</sub>):** (A) Zugmodul und Streckgrenzen aus Zugexperimenten. (B) Zugmodul-Zähigkeitsdiagramm zeigt simultanen Anstieg von Steifigkeit und Zähigkeit bei optimaler Menge von 3 mol% MBC. Das Komposit mit der randomisierten Referenz MBC<sup>SC</sup> zeigte hingegen keinen verstärkenden Effekt, was die Wichtigkeit der selektierten Peptid-Sequenz für die Grenzflächenstabilisierung unterstreicht (Zähigkeit bis maximal 1000% Dehnung. Römische Ziffern (I)-(IV) klassifizieren die Zugmoduln in (A)) und die Zähigkeiten in (B) in Gruppen, die sich jeweils mit einer Signifikanz von  $p > 0.05$  unterscheiden).



**Abbildung A4: Überblick der SEM-Aufnahmen nach MEW-Verarbeitung:** Definiert abgelegte Muster und damit der direkte Schreibmodus war nur mit kompatibilisierten Kompositen möglich (linke und mittlere Spalte). Nicht-kompatibilisierte Proben zeigten eine nahezu zufällige, chaotische Faserablage (rechte Spalte).

Tabelle A1: Elementare Zusammensetzungen nach Elementaranalyse von PCL, 1 wt% cMgF<sub>2</sub> und 1 wt% pMgF<sub>2</sub>.

Probe	theoretische Mengen <sup>a</sup>			
	C [%]	H [%]	O [%]	MgF <sub>2</sub> [%]
PCL	63.2	8.8	28.0	0.0
PCL/1 wt% cMgF <sub>2</sub>	62.5	8.7	27.8	1.0
PCL/1 wt% pMgF <sub>2</sub>	62.8	8.7	27.8	1.0

Probe	gemessen vor FDM-Verarbeitung				gemessen nach FDM-Verarbeitung			
	C [%]	H [%]	O [%] <sup>b</sup>	MgF <sub>2</sub> [%] <sup>c</sup>	C [%]	H [%]	O [%] <sup>b</sup>	MgF <sub>2</sub> [%] <sup>c</sup>
PCL	-	-	-	-	63.2±0.1	8.8±0.1	28.1±0.1	-
PCL/1 wt% cMgF <sub>2</sub>	62.7±0.1	8.8±0.1	27.8±0.1	<b>0.7±0.1</b>	62.4±0.1	8.8±0.1	27.8±0.1	<b>1.0±0.1</b>
PCL/1 wt% pMgF <sub>2</sub>	62.6±0.1	8.8±0.1	27.8±0.1	<b>1.0±0.1</b>	62.9±0.1	8.8±0.1	27.9±0.1	<b>0.4±0.1</b>

(a) Die theoretische PCL-Zusammensetzung basiert auf der Summenformel (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub> und der geplanten ω(MgF<sub>2</sub>). (b) Berechnet aus der molekularen Zusammensetzung von PCL (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub> ausgehend von ω(Kohlenstoff). (c) Berechnet ausgehend von der molekularen Zusammensetzung von PCL (C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>2</sub>)<sub>n</sub> ausgehend von der Massendifferenz aus Einwaage und gefundenem ω(Kohlenstoff) (Mittelwert ± Standardabweichung).

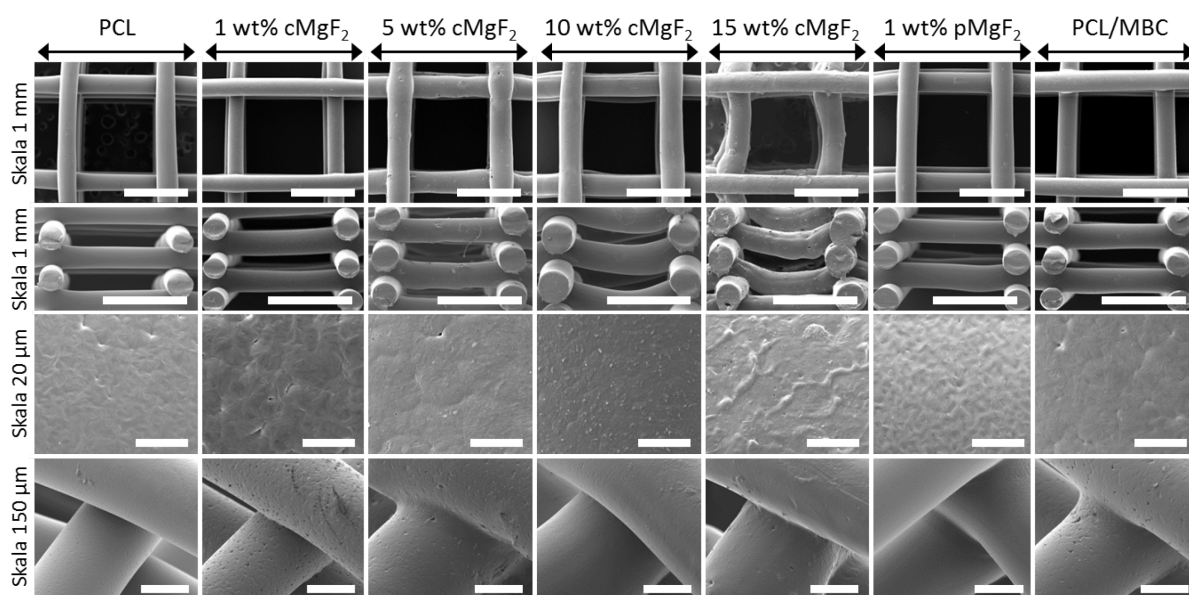


Abbildung A5: SEM-Überblick aller FDM-gedruckten Gerüste: Draufsicht (erste Zeile), Querschnitt (zweite Zeile), Morphologie der Filamente (dritte Zeile) und Verschmelzung zwischen Filamenten (vierte Zeile). Alle Komposite konnten durch FDM zu den gewünschten Architekturen verdrukt werden, wobei bei Mengen  $\geq 10$  wt% pMgF<sub>2</sub> durchhängende Filamente durch ein verändertes Verhalten der Schmelze bei konstanten Druckparametern beobachtet wurde. Das bestätigt, dass sowohl Zug- als auch Kompressionsversuche von Einzelfilamenten bzw. von 3D-Gerüsten nützlich sind, um die mechanischen Eigenschaften zu charakterisieren, weil bei Versuchen an den Gerüsten Netzwerkeffekte nicht eindeutig von der reinen Materialverstärkung zu trennen sind. Kompressionsversuche sind dagegen anwendungsnäher bei Knochenersatzmaterialien.



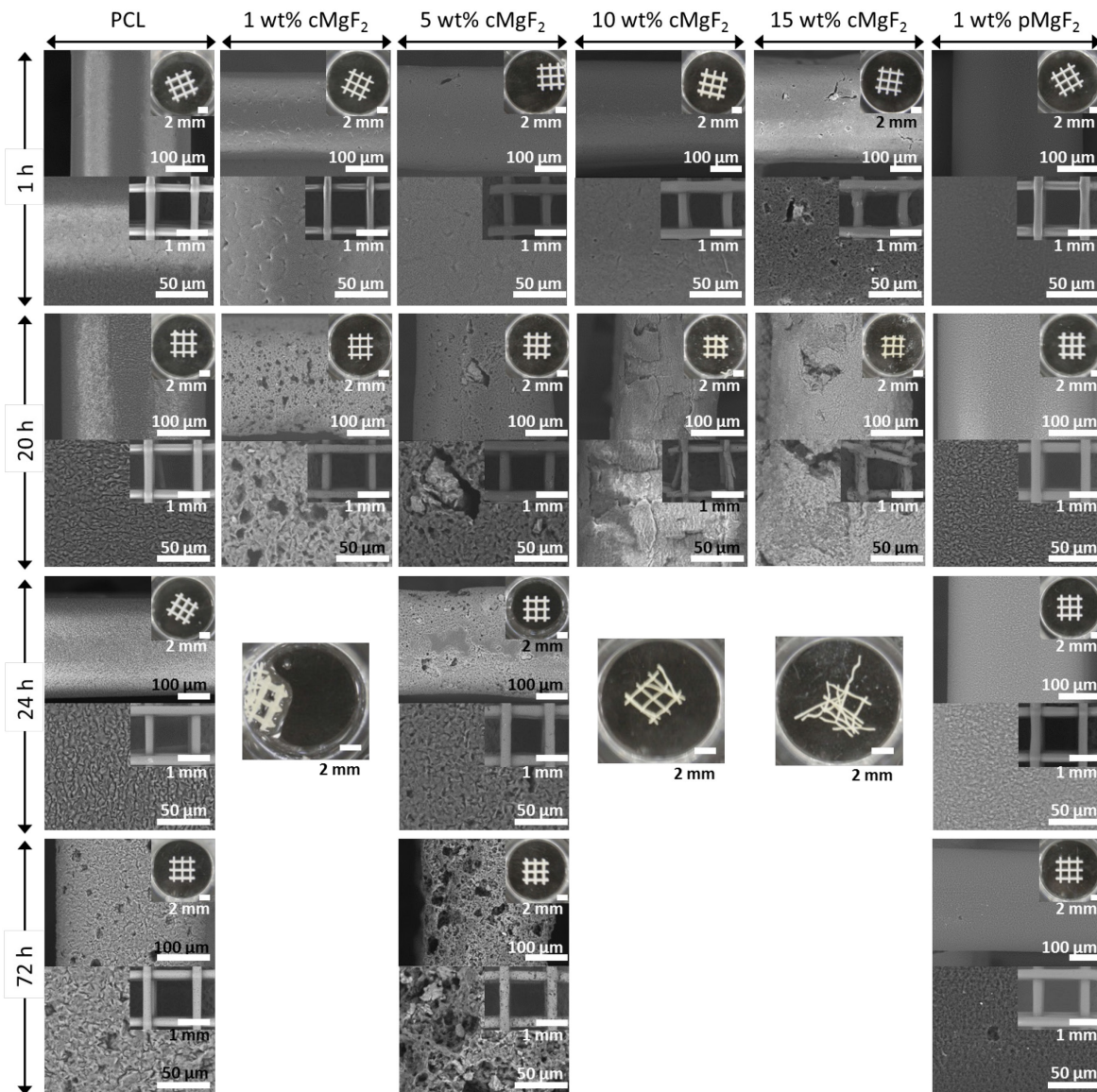


Abbildung A6: SEM-Aufnahmen der 3D-Gerüste nach verschiedenen Zeitpunkten der beschleunigten Abbaustudie (Bedingungen: 5 M NaOH<sub>aq</sub>, 37 °C. PCL/MBC nicht gezeigt, weil keine morphologischen Unterschiede zu reinem PCL zu beobachten waren. Vgl. Abbildung 61 für Massenverluste der Gerüste).

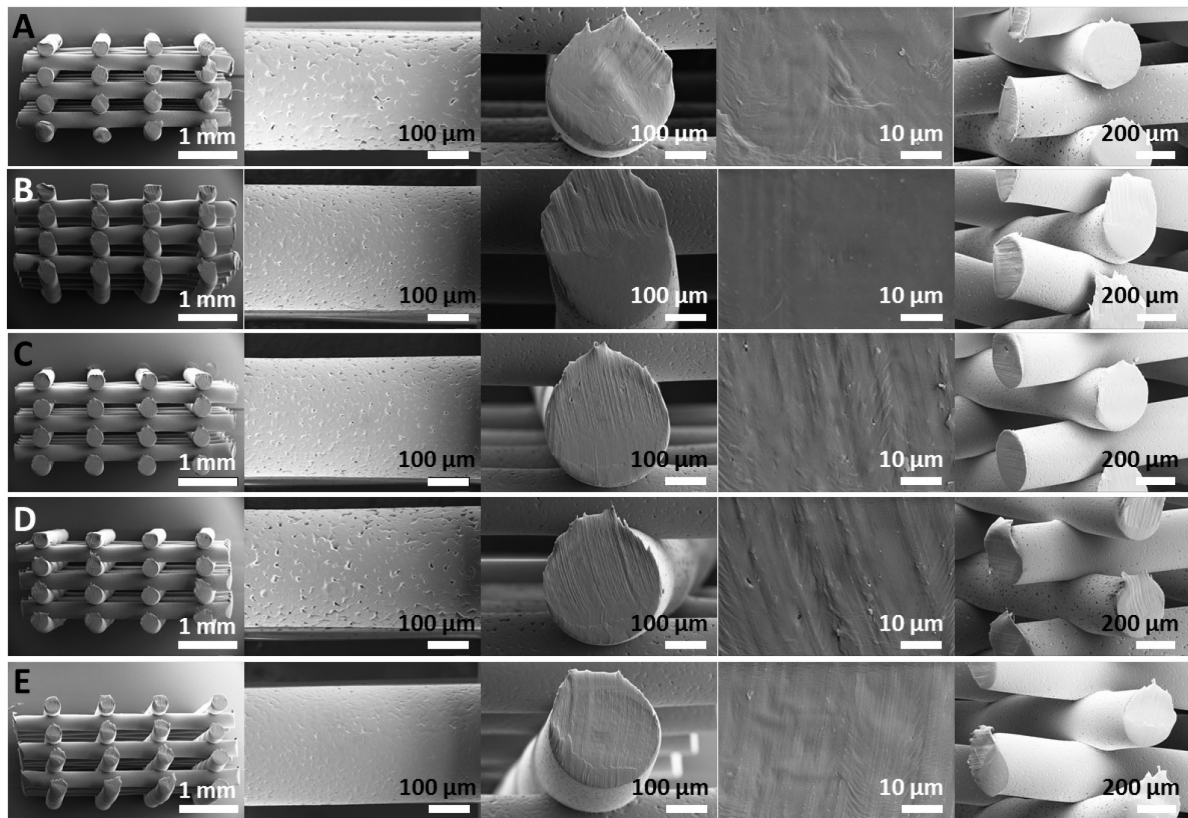


Abbildung A7: SEM-Aufnahmen von (A) reinem PCL, (B) ternärem PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub>, (C) PCL/5HA, (D) PCL/4HA und (E) PCL/1cMgF<sub>2</sub>; Dargestellt sind die Seitenansicht der Gerüste (links), Einzelfasern in der Draufsicht (Mitte links) und im Querschnitt (Mitte), die Vergrößerung der Schnittfläche der Fasern (Mitte rechts) und Verbindungspunkte der Fasern im Gerüst. Alle Zusammensetzungen waren ohne Komplikationen via FDM druckbar und wiesen keine optischen Unterschiede bei verschiedenen Zusammensetzungen auf.

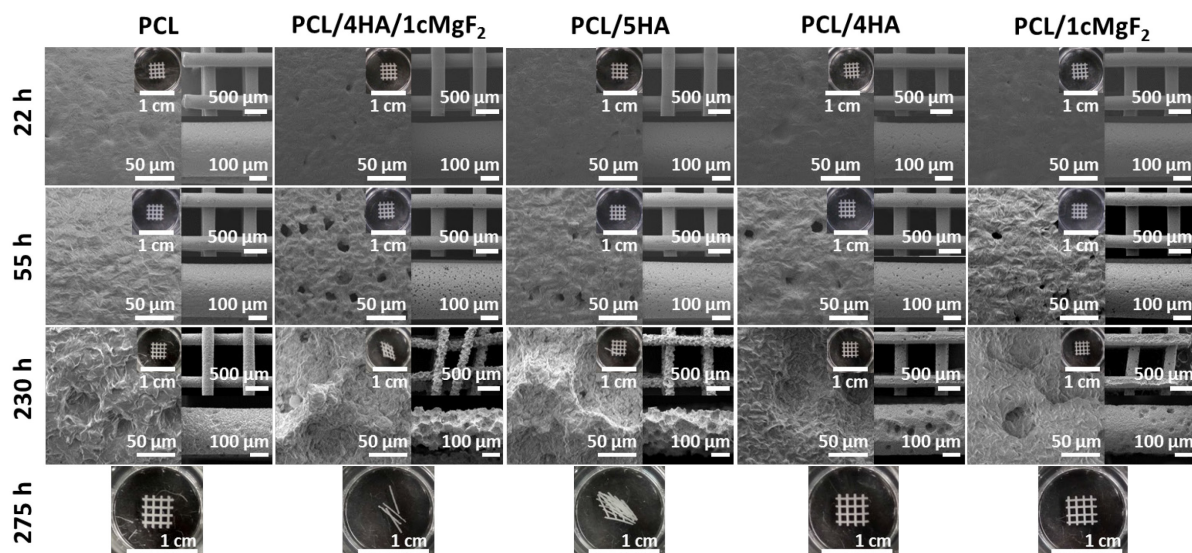


Abbildung A8: SEM-Aufnahmen der 3D-Gerüste nach verschiedenen Zeitpunkten der beschleunigten Abbaustudie (Bedingungen: 5 M NaOH<sub>aq</sub>, 37 °C. Vgl. Abbildung 76 für Massenverluste der Gerüste).



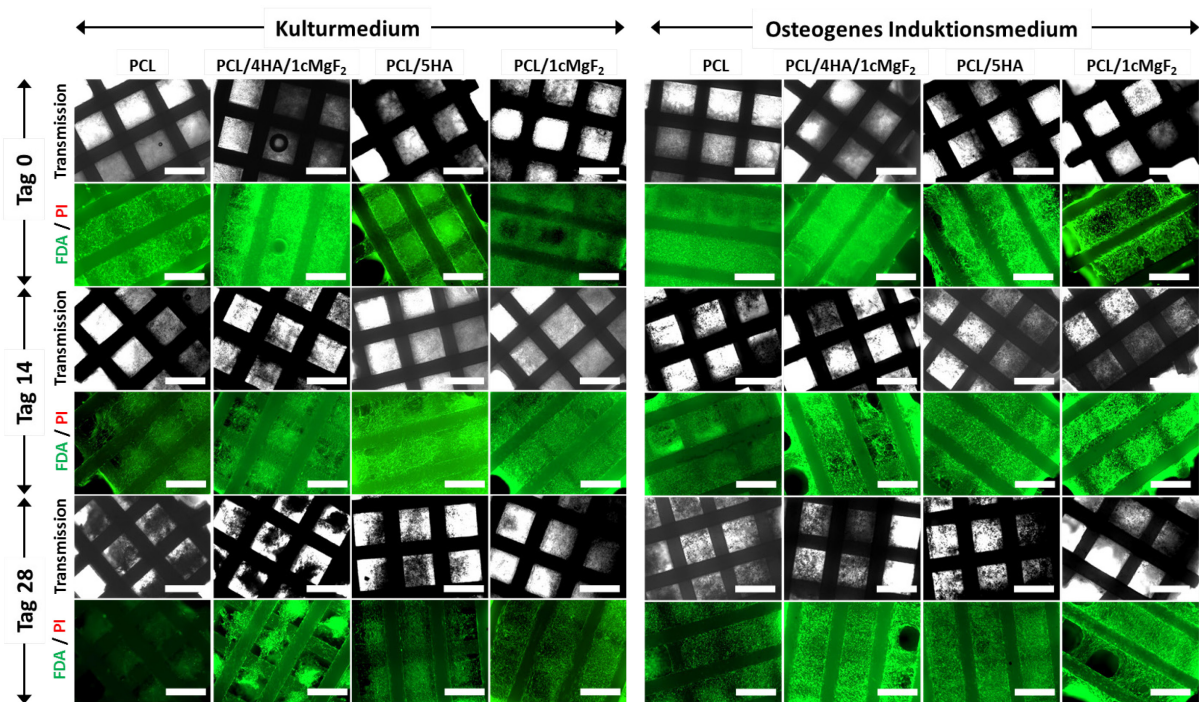


Abbildung A9: Zellviabilität von fetalen hMSCs angesiedelt auf den PCL- und Kompositgerüsten: FDA/PI (Live/Dead)-Verfahren und zugehörige Transmissionsaufnahmen von PCL, PCL/4HA/1cMgF<sub>2</sub>, PCL/5HA und PCL/1cMgF<sub>2</sub> an den Tagen 0, 14 und 28 (Bedingungen: Inkubation in osteogenem Induktionsmedium über vier Wochen, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre).

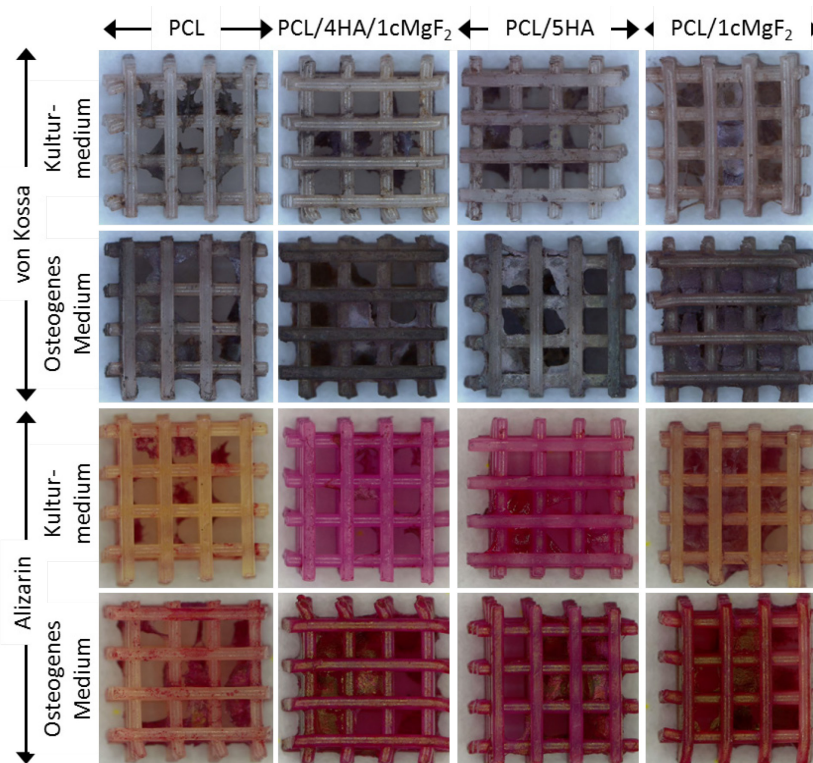


Abbildung A10: Von Kossa- (oben) und Alizarin-Färbung (unten) am Ende der vierwöchigen In-vitro-Studie (Tag 28). Besonders im osteogenen Induktionsmedium waren die Färbungen auf allen Kompositen intensiver als auf reinem PCL, wodurch das Potenzial zur Mineralisation deutlich wird (Kantenlänge der Gerüste ca. 5 mm, Bedingungen: Inkubation in Kultur- und osteogenem Induktionsmedium über vier Wochen, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-Atmosphäre).



## Danksagung

Zuerst möchte ich meinen Betreuern und Gutachtern danken: Prof. Börner für das multidisziplinäre Thema, das mich mit vielen verschiedenen Fachrichtungen, Arbeitsgruppen und Methoden in Kontakt gebracht hat, die reichlichen Richtungsvorgaben zur Entwicklung des Themas und das Vertrauen, eigene Schwerpunkte setzen zu dürfen. Außerdem geht mein Dank an Prof. Kemnitz für die stets zügige Unterstützung mit Rat und Tat und die vertrauensvollen Freiheiten, das gruppenübergreifend erdachte Thema zwar geführt, dennoch sehr selbstständig zu entwickeln. Prof. Hutmacher danke ich für die Möglichkeit zur Kooperation, die gewährten Einblicke ins *Tissue Engineering* durch ihn und seine großartige Gruppe und damit die Möglichkeit zur anwendungsnahen Forschung in einem der spannendsten Bereiche, denen ich im Laufe meiner Promotion begegnet bin. Auch Prof. Groll danke ich für die Möglichkeit, erste Tests bei ihm in Würzburg durchführen zu können.

Jetzt kommt der Teil, in dem ich vielen Menschen danken möchte, weil ich ohne ihre Erfahrung, ihre Hilfe, ihre Messungen diese Arbeit nicht hätte fertig stellen können. Die Fülle der nachfolgend genannten Menschen zeigt, wie wichtig die Zusammenarbeit vieler Leute bei interdisziplinären Projekten geworden ist. Es bedeutet aber auch, dass ich die Leistungen einzelner an dieser Stelle nur eingeschränkt hervorheben kann. Ich möchte die praktische Hilfe von und die Diskussionen mit PD Dr. G. Scholz, Dr. K. Scheurell, Clemens Flügel, Alexander Rehmer und Matthias Karg aus dem AK Kemnitz würdigen, die mir das Sol-Gel-Verfahren und zugehörige Charakterisierungsmethoden näher brachten. Auf dem *Tissue Engineering* Gebiet gebührt besonders Onur Bas („Thanks Mate“) und Gernot Hochleitner Dank, dass Sie mich auf ihren Spielwiesen haben mitspielen lassen und mich in den 3D-Druck eingeweiht haben. Selbes gilt für Dr. Cédryck Vaquette und Dr. Jing Lim, die unsere Materialien durch die biologischen Untersuchungen auf die nächste Anwendungsebene gehoben haben. Ich habe viel gelernt.

Noch mehr Menschen bin ich zu Dank verpflichtet, weil sie entweder Messungen für mich durchgeführt haben oder mich in Messtechniken eingewiesen haben. Dazu zählen u.a. Bharati Gupta (XPS), Dr. L. Rintoul (Raman), Dr. Chris Carvalho (Kontaktwinkel), Dr. Derrick Maxwell (Mechanik) und ihre Kollegen vom CARF und vom IHBI. Auch Valeria Samsoninkova (AFM, TEM) und Britta Seidt (Streuung) sind zu nennen, mit denen zusammen ich an verknüpften Themen gearbeitet habe. Hinzu kommen Melis Göktas

(SMFS), Dr. Jakub Jaroszewicz ( $\mu$ CT) und Dr. Carsten Fritz (DSC). An der BAM habe ich besonders durch Carsten Prinz (BET; Danke für dein Interesse an fremden Themen und deine geduldigen Erklärungen.), Dr. Franziska Emmerling, R. Granitza und Dr. Recknagel (ICP-OES), Fr. E. Lorenz und Dr. A. Thünemann (Mechanik), Dr. M. Gemeinert (MALS), Dr. F. Léonard und Dr. B. Müller (Radiographie) viel wohlgemeinte Unterstützung erfahren. Genauso gilt mein Dank den Kollegen aus dem Institut für Chemie wie Dr. G. Caputo, Dr. P. Russo und Prof. Pinna für TEM-Messungen, Dr. Kubsch in seiner immer netten und hilfsbereiten Art, Dr. Leistner (IR, SEC) und Dr. Björn Kobin (DSC, TGA) für ihren methodischen Erfahrungsschatz.

Außerdem soll Arbeit Spaß machen... und das ist mir dann doch größten Teils dank meiner Kollegen gelungen. Danke: Thorsten für die Einarbeitung, Stutzi für die Integration und den Gruppenzusammenhalt, Matze (stets der Zweite morgens im Labor - immer die gute Laune am Morgen), Regina (immer gut aufgelegt und hilfsbereit, aber gern auch mal die zurechtweisende Kraft), Maria (harte Schale, freundlicher Kern; danke für einige ausführliche fachlichen Diskussionen), Falk (Wer hat die Haare schön? Frag FalkoPedia) und Steffi (als gute Seele der Gruppe, ohne die es wesentlich weniger Arbeitskreisgeschenke gegeben hätte) für die tolle Stimmung in und zwischen den Arbeitsstunden, für lustige und ernste Diskussionen; Patrick und Seb für die Motivation durch eure guten Ergebnisse noch ein paar eigene nachzulegen. Nicht zu vergessen natürlich Felix, Dario, Carmen, Kathi, Sabine und Justus für manch eilige Messung oder Syntheseunterstützung, always-smiling Reddy, Meral und Emma für die ein oder andere NMR- bzw. SEC-Messung. Nachdem ich nun ansatzweise schon in einen neuen Job hinein schnuppern durfte, werde ich die entspannte, freundschaftliche Ebene, auf der ich hierarchieübergreifend die letzten Jahre arbeiten durfte, vermissen. Weiterer Dank geht an meinen Praktikanten Marco Eres, Bacheloranden Frank Bienwald und Diplomanden Marco Wegner für die Arbeiten, für die ich selber keine Zeit gehabt hätte und die Erfahrung, dass an einer Betreuung mehr dran ist als nur eine fertige Arbeit zu korrigieren.

Da das Leben allerdings nicht nur aus Arbeit besteht, möchte ich im Privaten meinen Eltern und Großeltern danken für die unendliche Unterstützung, weil ihr mir neben dem nicht enden wollenden Studium alles Wichtige ermöglicht habt und die Gewissheit mitgegeben habt, dass auch ein Scheitern mehr Erfahrungsgewinn als Drama gewesen wäre. Nicht zuletzt danke ich meiner Freundin Franzl. Sowohl auf privater aber auch auf fachlicher Ebene warst du mir mehr als einmal der beruhigende Pol, um Rückschläge

nüchtern zu betrachten und anschließend wegzustecken, die Motivation, mehr aus bestehenden Resultate zu machen, ohne sich auf Misserfolge zu konzentrieren. Deine Unterstützung beschränkte sich nicht nur auf den privaten Rückhalt, sondern bestand auch aus Text- und Bildverbesserungen, analytischen Messungen und Auswertungen bis hin zu einem gemeinsamen Projekt, das mehr aus dem Willen zusammenzuarbeiten als aus thematischer Nähe geboren ist. Danke, dass es sich gibt, meine kleine Chemikerin, die nicht so richtig eine sein will.

„Man muss viel gelernt haben, um über das, was man nicht weiß, fragen zu können.“

Jean-Jacques Rousseau

... und ich habe viel lernen dürfen.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre, dass ich die Dissertation selbstständig und nur unter Verwendung der von mir gemäß § 7 Absatz 3 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät vom 27.06.2012 angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Berlin, den 31.05.2017